

**Genetische Einflüsse allochthoner Wasserfrösche auf endemische
Wasserfroschpopulationen (*R. kl. esculenta* Komplex)**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Torsten Ohst

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ulrich Zeller
2. PD Dr. Mark-Oliver Rödel
3. Prof. Dr. Wolfgang Böhme

eingereicht: 08. Mai 2008

Datum der Promotion: 16. Oktober 2008

Die vorliegende Arbeit wurde durch die
Deutsche Bundesstiftung Umwelt
im Rahmen des Stipendienprogramms gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	IV
SUMMARY	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Neozoen – zur Problematik gebietsfremder Tiere	1
1.2 Der westpaläarktische Wasserfroschkomplex	3
1.3 Allochthone Wasserfrösche	6
1.3.1 Beispiele für Aussetzungen von Wasserfröschen	6
1.3.2 Allochthone Wasserfrösche in Deutschland	9
1.3.3 Populationsgenetische Folgen von Verschleppungen	10
1.4 Unterscheidung von Wasserfroscharten an Hand genetischer Merkmale	11
1.5 Verbreitung der Amphibien-Chytridiomykose - welchen Anteil können allochthone Wasserfrösche haben?	13
1.6 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	14
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Probenmaterial	16
2.1.1 Ursprung der Proben	16
2.1.2 Entnahme der Proben und Extraktion der DNA	16
2.2 Molekulare Datenerhebungen	19
2.2.1 Analysen der mitochondrialen DNA	19
2.2.2 Analysen der nukleären DNA	20
2.2.3 Klonierung von PCR-Produkten	21
2.2.4 DNA-Sequenzierungen	23
2.3 Sequenzanalytik	24
2.3.1 Bestimmung der Allele bei heterozygoten ITS2-Genotypen	24
2.3.2 Auswertung der Sequenzdaten heterozygoter Tiere	25
2.3.3 Berechnungen von Sekundärstrukturen der ITS2-Region	27
2.4 Abschätzung des Homoplasiegehalts im Datensatz	27
2.4.1 Anteil der Transitionen	27
2.4.2 Konsistenz- und Retentions-Index	28
2.4.3 Bootstrap-Test	28
2.5 Erstellung der Alignments und Stammbaumrekonstruktion	29
2.5.1 Maximum Likelihood-Verfahren	29
2.5.2 Maximum Parsimonie-Verfahren	30
2.6 Populationsgenetik	31
2.7 Vergleichende ökologische Untersuchungen	32
2.7.1 Kreuzungen und Aufzucht der Larven	32
2.7.2 Statistische Auswertung der Kreuzungsexperimente	33
2.8 Chytridiomykose-Nachweistests	34

3	ERGEBNISSE.....	35
3.1	Molekulare Daten.....	35
3.1.1	Datenumfang.....	35
3.1.2	Amplifikation und Sequenzierung der molekularen Marker	35
3.1.3	Sekundäre Strukturen der ITS2-Region	37
3.1.4	Genetische Variabilität und Erstellung der Alignments.....	39
3.1.4.1	ITS2-Region	39
3.1.4.2	ND3-Gen	41
3.1.5	Homoplasiegehalte der Datensätze	41
3.1.5.1	ITS2-Datensatz	41
3.1.5.2	Rekombinationen innerhalb der ITS2-Region	43
3.1.5.3	ND3-Datensatz.....	45
3.2	Differenzierung von Wasserfröschen an Hand der molekularen Datensätze	46
3.2.1	Phylogenetische Analysen	46
3.2.1.1	ITS2-Region	46
3.2.1.2	ND3-Gen	52
3.2.2	Geographische Verteilung der ITS2-Allele und mt-Genotypen.....	54
3.2.2.1	Verbreitung der ITS2-Allele in der Westpaläarktis.....	54
3.2.2.2	Verbreitung der ITS2-Allele und mt-Genotypen in Deutschland	55
3.2.3	Häufigkeiten der genetischen Merkmale	59
3.2.4	Populationsgenetische Analysen der einheimischen Populationen.....	64
3.2.5	Differenzierung der genetischen Merkmale.....	66
3.3	Kreuzungsexperimente.....	68
3.3.1	Vergleich der Larvenmassen.....	68
3.3.2	Vergleich der Entwicklungsstadien.....	70
3.4	Nachweise der Chytridiomykose	72
4	DISKUSSION.....	74
4.1	Sammlung der Proben	74
4.2	Genetische Marker	75
4.2.1	ITS2-Region	75
4.2.2	Mitochondriales ND3-Gen	78
4.3	Genetische Differenzierungen und Verwandtschaftsanalysen	79
4.3.1	Vergleich der ITS2-Daten mit anderen Merkmalskomplexen	79
4.3.2	<i>R. ridibunda</i> -Gruppe.....	80
4.3.3	<i>R. lessonae</i> -Gruppe	81
4.4	Allochthone Formen in der heimischen Wasserfroschfauna	82
4.4.1	Geographischer Ursprung autochthoner <i>R. ridibunda</i>	82
4.4.2	Ursprünge allochthoner Wasserfrösche in Deutschland.....	84
4.4.3	Verbreitung allochthoner Wasserfrösche in Deutschland.....	85
4.4.4	Genetische Introgressionen	86
4.5	Kreuzungsexperimente.....	87
4.6	Allochthone Wasserfrösche als potentielle Krankheitsüberträger.....	89
4.7	Schlussbetrachtungen und Handlungsempfehlungen	91
4.7.1	Bewertung von Neozoen.....	91
4.7.2	Bedeutung und weitere Entwicklung allochthoner Wasserfrösche	93
4.7.3	Braucht Zentraleuropa mehr Wasserfroschformen?	94

5	ABKÜRZUNGEN	95
6	LITERATUR	96
	ANHANG 1: Liste aller untersuchten Proben und der bestimmten Genotypen.	106
	ANHANG 2: Bilder ausgewählter Fundorte	114
	ANHANG 3: Entwicklungsstadien der aufgezogenen Larven (nach Günther 1990)	116
	ANHANG 4: Alignment der ITS2-Sequenzen	117
	ANHANG 5: Alignment der ND3-Sequenzen	119
	ANHANG 6: Paarweise Vergleiche der ITS2-Allele	121
	ANHANG 7: Paarweise Vergleiche der mt-Genotypen (ND3).....	122
	Publikationsliste.....	124
	Danksagung	125
	Eidesstattliche Erklärung.....	126

ZUSAMMENFASSUNG

Gebietsfremde (allochthone) Wasserfrösche haben in Deutschland, wie auch in vielen anderen Ländern Europas, zu Faunenverfälschungen geführt, da immer wieder importierte Frösche ausgesetzt wurden und wohl auch heute noch werden. Allochthone Wasserfrösche, die meist aus Südosteuropa und Anatolien stammen, konkurrieren nicht nur mit einheimischen Tieren, sie stellen auch aus genetischer Sicht eine Bedrohung der Bestände dar. Auf Grund der kaum ausgeprägten prä- und postzygoten Isolationsmechanismen kommt es zur Introgressionen allochthoner Gene in den endemischen Genpool.

In der vorliegenden Arbeit wurden die nukleären (ITS2-Region) und mitochondrialen (ND3-Gen) Genotypen von 447 in Deutschland gesammelten Gewebeproben sowie 460 Proben aus anderen Teilen Europas bestimmt und verglichen. Im Gesamtdatensatz konnten 56 ITS2- und 65 ND3-Genotypen nachgewiesen werden. Unter den 20 in Deutschland gefunden ITS2-Allelen wurden zwei *R. ridibunda*-ähnliche Genotypen als autochthon und fünf als allochthon erkannt (Häufigkeit 7 %), der Status weiterer fünf ITS2-Allele war nicht klar zu belegen. Unter den 14 mitochondrialen Genotypen der *R. ridibunda*-Gruppe befanden sich drei autochthone, zehn allochthone (Häufigkeit 18 %) sowie eine Variante mit unklarem Status.

Allochthone Genommerkmale wurden vor allem in Populationen in Südwestdeutschland entlang des Rheins und im Ruhrtal nachgewiesen. Im Raum Karlsruhe konnte ein mitochondrialer Genotyp mit hohem Anteil festgestellt werden, der typisch für eine bisher nur aus Italien bekannte Art ist (*Rana bergeri*).

Da allochthone ITS2-Allele häufig heterozygot gemeinsamen mit autochthonen Varianten auftreten, gibt es eindeutige Hinweise auf Hybridisierungen zwischen einheimischen und eingeschleppten Wasserfröschen. Durch Aufzuchtsexperimente wurde keine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit von F1-Hybriden aus Kreuzungen zwischen autochthonen *R. ridibunda* und allochthonen *R. cf. ridibunda* aus Anatolien festgestellt. Die Larven der Hybriden wiesen aber eine deutlich höhere Varianz in der Entwicklungsgeschwindigkeit gegenüber den Nachkommen homotypischer Kreuzungen auf.

Um die Rolle allochthoner Wasserfrösche bei der Verbreitung von Krankheitserregern beurteilen zu können, wurden Nachweistests für die erst vor wenigen Jahren beschriebene Chytridiomykose bei Amphibien an Gewebeproben einheimischer Tiere durchgeführt. Die Nachweistests ergaben eine Prävalenz des Erregers (*Batrachochytrium dendrobatidis*) von 6,3 % bei Proben die aus Deutschland stammten. Da die Chytridiomykose überwiegend in Populationen auftrat, in denen auch allochthone Wasserfrösche vorkamen, wird ein Zusammenhang zwischen Einschleppungsereignissen und dem Auftreten des Erregers vermutet.

Schlagnworte: Wasserfrösche, *Rana ridibunda*, allochthon, Genintrogression, ITS2, ND3, Hybriden, Chytridiomykose

SUMMARY

Allochthonous (non-native) water frogs have been introduced into Germany and other European countries. These ongoing translocations of water frogs, mostly originating from the Balkans and Anatolia, changed the composition of the native herpetofauna. Non-native individuals not only compete with autochthonous water frogs, but also threaten the genetic integrity of native populations. The lack of pre- and postzygotic reproductive isolation mechanisms between many European water frogs may cause the introgression of exotic genes into the gene pool of native populations.

In the present work the nucleic ITS2-region and the mitochondrial ND3-gen were used as markers to determine and compare the genotypes of 447 water frog samples collected in Germany as well as 460 samples from various European countries.

In the complete dataset 56 ITS2- and 65 ND3-genotypes were identified. Among the 20 ITS2-alleles found in Germany, two indigenous and five introduced *Rana ridibunda*-like genotypes (relative frequency 7%) occurred. Five *R. ridibunda* alleles could not assigned as either indigenous or exotic. Among the 14 mitochondrial genotypes of the *R. ridibunda*-group three autochthonous and ten introduced (relative frequency 18%) variants could be identified, whereas the status of one mt-genotype remained unclear.

Exotic alleles were mainly found in southwest Germany along the river Rhine and along the Ruhr in the Ruhr area. The wide distribution of a mitochondrial genotype previously known from Italian water frogs (*R. bergeri*) was ascertained in the region surrounding Karlsruhe.

Allochthonous ITS2-alleles often occur heterozygously combined with autochthonous alleles. This is a strong evidence for cases of hybridisations between indigenous and introduced water frogs.

Crossing experiments between autochthonous *R. ridibunda* and Anatolian water frogs (*R. cf. ridibunda*) revealed no reduced viability among the F1-hybrids. However, the hybrids showed a much higher variation in development rate compared to the progenies of homotypic crosses.

To evaluate the possible role of introduced water frogs on the dispersal of infectious diseases, detection tests of the recently discovered chytridiomycosis in amphibians were carried out. The detection tests for its pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on the tissue samples collected in Germany showed a prevalence of 6.3%.

Most of the infected frogs were found in populations influenced by non-native water frogs. This points towards a possible relationship between introduction events and the occurrence of the pathogen.

Keywords: water frogs, *Rana ridibunda*, allochthonous, gene introgression, ITS2, ND3, hybrids, chytridiomycosis

1 EINLEITUNG

1.1 Neozoen – zur Problematik gebietsfremder Tiere

Die Zusammensetzung der Flora und Fauna Mitteleuropas wird durch eine bereits lange währende und bis heute anhaltende Einflussnahme des Menschen mitbestimmt. Großflächige Veränderungen der Landschaftsstrukturen und die Verbreitung von gebietsfremden Tier- und Pflanzenarten (Neobiota) haben das ursprüngliche Artenspektrum vielerorts deutlich verändert. Die Verschleppung von Tieren und Pflanzen kann die Wirkung geografischer Isolation aufheben, was die wichtigste Voraussetzung für die Entstehung neuer Arten und zur Aufrechterhaltung der Diversität existierender Lebensformen ist (VITOUSEK et al. 1997, LÖVEI 1997). Weltweit gesehen stellt die willkürliche als auch die unbeabsichtigte Verbreitung gebietsfremder Tier- und Pflanzenarten (Neozoen und Neophyten) eine der größten Bedrohungen der Biodiversität dar (STREIT 1991, RHYMER & SIMBERLOFF 1996, MACK et al. 2000, KOWARIK 2003). Als Neozoen werden Tiere bezeichnet, die seit Beginn der Neuzeit (1492) unter direkter oder indirekter Mitwirkung des Menschen in ein bestimmtes Gebiet gelangt sind, in dem sie vorher nicht heimisch waren und dort neue Populationen aufgebaut haben (KINZELBACH 1996, GEITER et al. 2002).

Gebietsfremde Tierarten mit einem breiten Nahrungsspektrum (Generalisten) und der Fähigkeit, sehr verschiedene Habitate zu besiedeln (Ubiquisten), können in der Regel auf Kosten von zumeist konkurrenzschwächeren oder spezialisierten einheimischen Arten neue Lebensräume besetzen. Von einer Bereicherung der einheimischen Fauna durch ausgesetzte Arten kann mit Ausnahme der Nutz- und jagdbaren Tiere nicht ausgegangen werden (TREPL & SUKOPP 1993, THIESMEIER et al. 1994).

Neozoen können in vielschichtiger Weise auf ihre neue Umwelt einwirken. So verursacht z. B. der eingeschleppte Bisam (*Ondatra zibethica*) erhebliche Schäden an Wasser- und Deichbauten (BURGHAUSE et al. 1996) und reduziert die Bestände von Flussmuscheln (HOCHWALD 1990). Andere Neozoen stellen Konkurrenten autochthoner Arten dar, wie dies beim eingeführten Mink (*Mustela vison*) und dem europäischen Nerz (*M. lutreola*) beobachtet werden kann. Sind Hybridisierungen zwischen autochthonen und allochthonen Arten möglich, kann die Identität heimischer Arten durch genetische Introgressionen verloren gehen. Beispielhaft seien hier Hybridenbildungen der beiden erwähnten Marderarten sowie zwischen der Weißkopf- und Schwarzkopfruderente (*Oxyura leucocephala* - *O. jamaicensis*) genannt (HUGHES et al. 2006).

Mit zunehmendem Forschungsaufwand werden immer mehr invasive Arten entdeckt, wobei der Kenntnisstand zu deren Einflüssen auf die heimischen Biozöten als insgesamt sehr defizitär bezeichnet werden muss (GEITER et al. 2002). Auch wenn in Europa das Bedrohungspotential durch Neozoen gegenüber Inseln wie Neuseeland oder Hawaii (z. B. ASQUITH 1995, O'DONNELL 1996, BLACKBURN et al. 2004) geringer ausgeprägt scheint, da das große und vielgestaltige Festlandsareal bedrohten Tierarten viele Rückzugs- oder Ausweichmöglichkeiten bietet (GEITER et al. 2002), kann eine zusätzliche Beeinträchtigung bereits gefährdeter Arten durch Neozoen weitere

Bestandsrückgänge forcieren. Neben den etwa 65.000 autochthonen Tierarten konnten bis zum Jahr 2000 in Deutschland 1123 Neozoen nachgewiesen werden, wovon 262 stabile und umfangreiche Freilandpopulationen (etablierte Neozoen) bilden (GEITER et al. 2002). Dieser Studie zufolge wurden unter den in Deutschland etablierten Neozoen noch keine Amphibienarten gefunden. Es gibt allerdings zunehmend Hinweise darauf, dass der Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*) in naher Zukunft zu den etablierten Arten gezählt werden muss. Nachdem einige Individuen dieser Art vor etwa 15 Jahren nördlich von Karlsruhe ausgesetzt wurden, konnten die Bestände trotz gezielter Bekämpfungsmaßnahmen (z. B. Fang adulter Tiere und Abfischen der Larven) kaum dezimiert werden (LAUFER 2001, und pers. Mitteilung). Der Ochsenfrosch hat sich über mehrere Jahre hinweg in verschiedenen Gewässern reproduziert (LAUFER & WAITZMANN 2002), in denen sowohl das Verschwinden bisher nachgewiesener einheimischer Amphibienarten als auch ein Rückgang der Individuenzahlen beobachtet wurde (LAUFER & SANDTE 2004). Im Falle einer großflächigen Verbreitung kann der Ochsenfrosch zu einer erheblichen Dezimierung der ohnehin vielfältig bedrohten einheimischen Amphibienbestände beitragen.

Der Ochsenfrosch gilt auch als gutes Beispiel für die Komplexität der Einflüsse, welche Neozoen auf die endemische Fauna haben können und den Forschungsaufwand, der nötig ist, um diese zu erfassen. So wurde von mehreren Autoren angenommen, der Ochsenfrosch sei ein Prädator speziell von anderen Amphibien und der beobachtete Rückgang der kleineren einheimischen Formen habe hauptsächlich in der Ausbreitung des Ochsenfrosches seine Ursache (Übersicht in LAUFER & WAITZMANN 2002). Experimentelle Untersuchungen zeigten, dass es neben dem Raubdruck und der Nahrungskonkurrenz auch eine ausgeprägte interspezifische Wachstumshemmung gibt, wodurch die Entwicklung einheimischer Amphibien- durch Ochsenfroschlarven besonders stark unterdrückt wird (LAUFER & SANDTE 2004). Intra- und interspezifisch wirkende Hemmungen der Larvalentwicklung, an der eine über den Kot der Larven im Wasser verbreitete Alge beteiligt ist (BEEBEE 1991, WONG & BEEBEE 1994), konnten für mehrere einheimische Amphibienarten nachgewiesen werden (BERGER 1968, HEUSSER 1972, BANKS & BEEBEE 1987, SINSCH 1998). Diese tritt aber besonders häufig im Zusammenhang mit dem Ochsenfrosch auf. Welchen Anteil die Konkurrenz während der Larvalphase an der Verdrängung der einheimischen Amphibien aus den Laichgewässern von Ochsenfröschen hat, bleibt noch zu klären.

Analog zum Begriff „Neozoen“ werden gebietsfremde, unter anthropogener Einwirkung verschleppte Tierpopulationen (allochthone Populationen), die sich in dem Zielgebiet mit verwandten Populationen genetisch vermischen können, auch als Paraneozoen bezeichnet (GEITER et al. 2002). Autochthone Populationen hingegen sind im betrachteten Gebiet entstanden oder unter natürlichen Bedingungen dort eingewandert.

Auch das Einschleppen von Individuen derselben Art aus weit entfernten Populationen kann gravierende Auswirkungen auf autochthone Populationen haben (STOCKWELL et al. 1996, OLDEN et al. 2004). Häufig stellen die als Populationen betrachteten Gruppen von Individuen unterschiedliche Evolutionseinheiten dar (HINDAR 1999), insbesondere wenn zwischen diesen ein

eingeschränkter oder über bestimmte Zeiträume unterbrochener Genfluss besteht. Durch genetische Drift kann es zur Akkumulation spezieller Merkmale in den Subpopulationen kommen, verschiedene Selektionsfaktoren können zum Erwerb spezifischer Anpassungen an unterschiedliche Lebensräume führen. Da nicht geklärt ist, inwieweit das Einkreuzen gebietsfremden Genmaterials zur Veränderung bzw. zum Verlust genetischer Anpassungen und Authentizität der autochthonen Populationen führt, ist auch die Verschleppung von Individuen einer Art zwischen weit entfernten Gebieten kritisch zu bewerten (GEIGER & WAITZMANN 1996).

1.2 Der westpaläarktische Wasserfroschkomplex

Unter den derzeit aus der westlichen Paläarktis beschriebenen Wasserfroscharten hat *Rana ridibunda* (Seefrosch) das größte Verbreitungsgebiet, welches weite Teile Europas, Mittel- und Vorderasiens umfasst (Abb. 1, GÜNTHER 1990, DUBOIS & OHLER 1994). Vor allem in den südlichen und östlichen Teilen ihres Areals konnten in den letzten Jahren durch den Einsatz molekularer Methoden eine Vielzahl eng verwandter Wasserfrosch-Linien identifiziert werden, die gegenwärtig noch unter dem Namen *R. ridibunda* geführt werden (Abb. 2, PLÖTNER 1998, OHST 2001, PLÖTNER 2005, LYMBERAKIS et al. 2007). Eine besonders hohe Variabilität wurde innerhalb der hier als *R. cf. ridibunda* bezeichneten Formen aus Anatolien und Zentralasien gefunden, einschließlich der Typuslokalität von *R. ridibunda* am Nordufer des Kaspischen Meeres (siehe dazu PLÖTNER 2005).

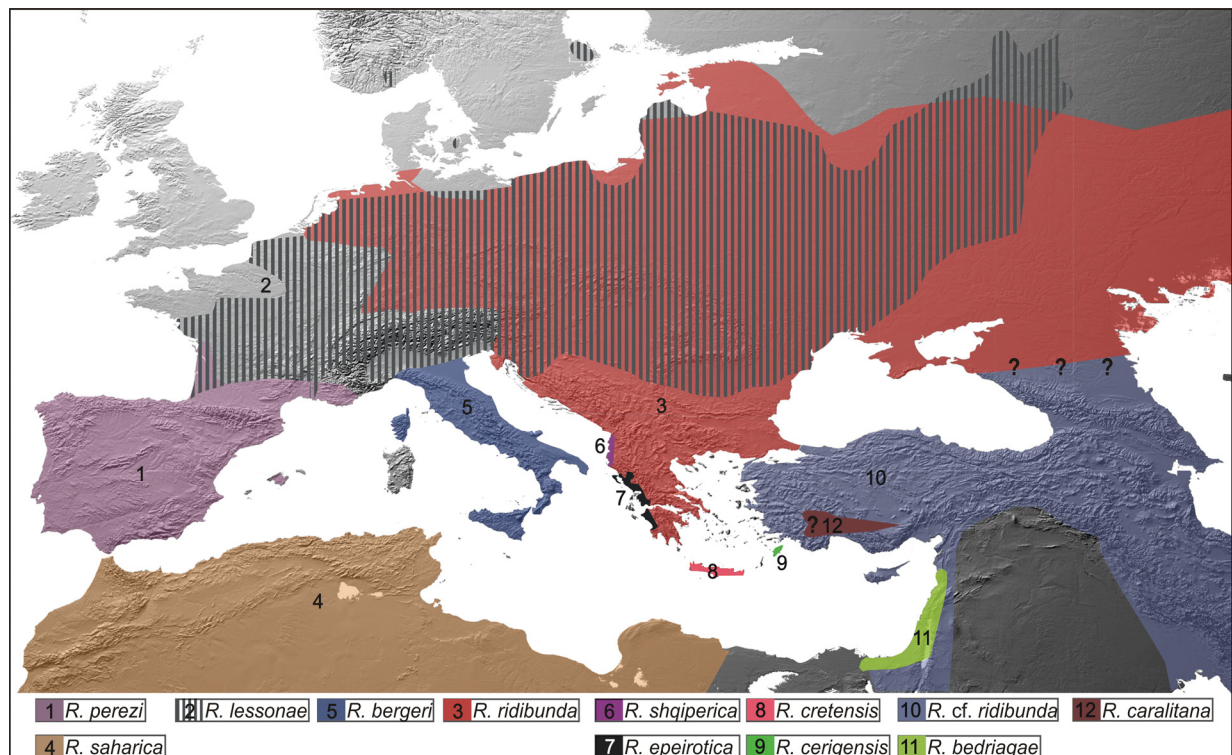


Abb. 1: Verbreitungsgebiete der westpaläarktischen Wasserfroscharten. Die Areale von *R. susana* und *R. terentievi* sind nicht dargestellt.

Es gibt demnach Hinweise, dass innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe kryptische Arten auftreten, deren Beschreibungen aufgrund des Fehlens geeigneter Merkmalskomplexe bisher nicht erfolgen konnten. Den mt-Daten zu Folge, sind die genetischen Distanzen zwischen vielen Linien innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe, zu der auch *R. cerigensis* und *R. caralitana* gezählt werden, im Vergleich zu anderen interspezifischen Differenzierungen, geringer ausgeprägt (Abb. 2). Auch wenn der Artstatus von *R. cerigensis* und *R. caralitana* von einigen Autoren anerkannt wird (ARIKAN 1988, JDEIDI et al. 2001, BEERLI et al. 1994), sollten weitere Merkmalskomplexe (z. B. die Analyse von nukleären Genen) von Vertretern aller Linien innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe untersucht und bei der Bewertung des jeweiligen systematischen Status berücksichtigt werden.

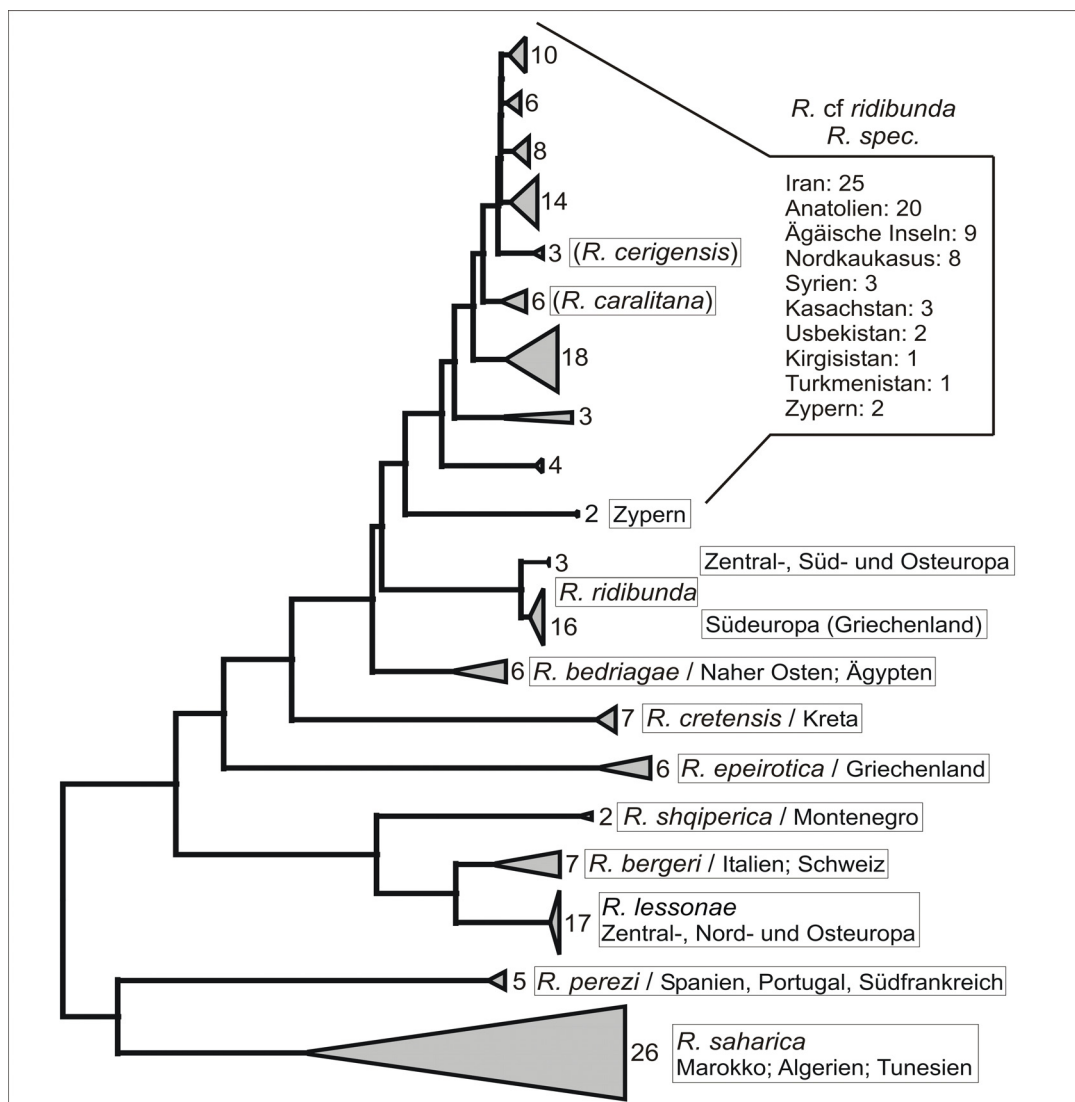


Abb. 2: Stammbaumrekonstruktion (NJ) basierend auf den DNA-Sequenzen der mitochondrialen ND2- und ND3-Gene (Daten aus PLÖTNER et al. 2001, PLÖTNER & OHST 2001 sowie teilweise unveröff.). Die grauen Dreiecke fassen Populationen bzw. eng verwandte Formen zusammen. Die Höhe der Dreiecke korrespondiert mit der Zahl der mt-Genotypen (daneben angegeben). Die Länge der Dreiecke gibt die Divergenz zwischen den zusammengefassten Formen wieder.

Die genetische Vielfalt der in Deutschland und Mitteleuropa gefundenen Seefroschformen (3 mt-Genotypen; auf Basis des ND2- und ND3-Gens) ist im Vergleich zu Südeuropa und Anatolien (36 mt-Genotypen) deutlich geringer (Abb. 2, PLÖTNER & OHST unveröff.). Die Ursache hierfür dürfte in der nacheiszeitlichen Ausbreitung der Wasserfrösche liegen. Ausgehend von wenigen Populationen in den südlichen Refugialräumen erfolgte die Besiedlung der nördlichen Lebensräume (vgl. TABERLET et al. 1998, HEWITT 1999).

Auch das Verbreitungsgebiet von *R. lessonae* (Kleiner Wasserfrosch) ist vergleichsweise groß und dehnt sich von der französischen Atlantikküste über Zentraleuropa bis in den Raum Moskau aus, reicht aber im Vergleich zu *R. ridibunda* nicht so weit nach Süden. Die bisher wenig untersuchte genetische Variabilität von *R. lessonae* scheint sehr gering zu sein (OHST 2001, BEEBEE et al. 2005).

Im mediterranen Raum sind mit *R. saharica*, *R. perezi*, *R. bergeri*, *R. shqiperica*, *R. epeirotica*, *R. cretensis* und *R. bedriagae* sieben weitere Arten verbreitet, die zumeist auf kleinere Areale beschränkt sind (Abb. 1). Die Variabilität unter den Populationen der rund um das Mittelmeer verbreiteten Wasserfroscharten ist deutlich höher als bei den Arten in den nördlichen Gebieten. So weisen die unter *R. saharica* zusammengefassten Linien in Nordafrika genetische Divergenzen auf, die auf das Vorkommen weiterer, bisher nicht beschriebener Arten hindeuten (Abb. 2, BUCKLEY et al. 1994, ARANO et al. 1998, HARRIS et al. 2003, PLÖTNER et al. unveröff.).

Die Hybridenbildung zwischen vielen Wasserfroschtaxa stellt ein interessantes und viel untersuchtes Phänomen innerhalb des Wasserfroschkomplexes dar. Neben „normalen“ (Mendelschen) Hybriden zwischen sympatrisch vorkommenden Wasserfroscharten, z. B. zwischen *R. ridibunda* / *R. shqiperica* und *R. ridibunda* / *R. epeirotica* (BERGER et al. 1994), treten mehrere Formen hybridogenetischer Hybriden auf. Die größte Verbreitung weist die in Zentraleuropa sehr häufige Hybridform *R. kl. esculenta* (Teichfrosch) auf. Diese weitgehend fertile Hybridform ging ursprünglich aus interspezifischen Kreuzungen zwischen *R. lessonae* und *R. ridibunda* hervor (Primärbastardierungen) (BERGER 1967, 1968b). In den meisten Populationen kann sich *R. kl. esculenta* über Rückkreuzungen mit jeweils nur einer Elternart reproduzieren, wodurch das Fortbestehen der Hybriden unabhängig von Primärbastardierungen ermöglicht wird. In Mischpopulationen mit *R. lessonae* bildet der Teichfrosch Gameten, die ein vollständiges, nicht-rekombiniertes Genom von *R. ridibunda* enthalten. Wenn *R. kl. esculenta* syntop mit *R. ridibunda* auftritt werden dagegen überwiegend Gameten gebildet, die den Chromosomensatz von *R. lessonae* enthalten. Zur Kennzeichnung hybridogenetischer Hybriden wurde das Kürzel „kl.“ (für klepton) vorgeschlagen, das zwischen Gattungs- und Artnamen gesetzt wird (DUBOIS & GÜNTHER 1982). Bei *R. kl. esculenta*-Individuen wird während der Gametogenese der Chromosomensatz der syntopen Elternart vollständig ausgeschlossen, so dass Rekombinationen zwischen den elterlichen Genomen nur stark eingeschränkt stattfinden (TUNNER 1973, GÜNTHER 1983).

Da ein elterliches Genom klonal vererbt wird und das andere innerhalb der Population rekombiniert werden kann, wird diese Fortpflanzungsweise auch als hemiklonal bezeichnet.

Außer bei *R. kl. esculenta* konnte der hybridogenetische Reproduktionsmodus noch für den Italienischen Hybridfrosch, *R. kl. hispanica* (UZZELL & HOTZ 1979), und den in Südfrankreich sowie der Iberischen Halbinsel verbreiteten Grafschen Hybridfrosch, *R. kl. grafi* (GRAF et al. 1977) nachgewiesen werden.

1.3 Allochthone Wasserfrösche

1.3.1 Beispiele für Aussetzungen von Wasserfröschen

Die Wasserfroschpopulationen, welche nacheiszeitlich durch natürliche Ausbreitungsprozesse ihre heutigen mitteleuropäischen Lebensräume erreicht haben, werden hier als autochthone Populationen angesehen.

In der Vergangenheit wurden in vielen Ländern Europas Wasserfrösche aus unterschiedlichen Motiven ausgesetzt. An einigen gut dokumentierten Beispielen sollen Beweggründe, Geschichte und Folgen der Aussetzungen dargestellt werden.

Im Süden Englands sind alle drei mitteleuropäischen Wasserfroschformen, Teichfrosch (*R. kl. esculenta*), Seefrosch (*R. ridibunda*) und Kleiner Wasserfrosch (*R. lessonae*) während der letzten 200 Jahre wiederholt ausgesetzt worden (ZEISSET & BEEBEE 2001). Allerdings konnten nur wenige der ausgesetzten Tiere Populationen bilden, die bis heute überlebten.

Durch die Analyse genetischer und bioakustischer Daten wurden in südenglischen Populationen vier verschiedene Wasserfroscharten sowie *R. kl. esculenta* nachgewiesen (WYCHERLEY et al. 2003, WYCHERLEY & BEEBEE 2003). Neben den drei mitteleuropäischen Formen sind dort also noch mindestens zwei weitere Wasserfroscharten eingeschleppt worden. Bioakustischen Untersuchungen zu Folge handelt es sich dabei wahrscheinlich um *R. perezi* und *R. bergeri*. Darüber hinaus gibt es Hinweise für das Auftreten von Hybriden zwischen den ausgesetzten Arten.

Die Ergebnisse molekulargenetischer, bioakustischer und paläontologischer Untersuchungen legten den Schluss nahe, dass in Südengland neben den eingeschleppten *R. lessonae*, auch eine autochthone Population von *R. lessonae* existierte (Übersicht in BEEBEE et al. 2005). Nach dem unter acht Festlandspopulationen die nächst verwandten Populationen zu den inzwischen ausgestorbenen, autochthonen britischen *R. lessonae* bestimmt waren, wurden im Jahr 2005 75 Tiere einer schwedischen Population ausgesetzt, denen in den nächsten Jahren weitere folgen sollen (FOSTER 2005). Diese schwedischen *R. lessonae* sollen den Grundstock für eine neue, „annähernd autochthone“, Besiedlung Großbritanniens bilden.

Aussetzungen von *R. ridibunda*, die zu keiner dauerhaften Etablierung führten, sind aus Skandinavien bekannt. Im Süden Finnlands ausgesetzte *R. ridibunda* bildeten zwischen den 1930er und '50er Jahren stabile, reproduzierende Populationen. Vermutlich führten klimatische

Veränderungen, schwindende Nahrungsgrundlagen und zunehmende Abwasserbelastungen der Veränderungen, schwindende Nahrungsgrundlagen und zunehmende Abwasserbelastungen der dortigen Gewässer zum Erlöschen der Populationen (TERHIVUO 1981). Auch *R. ridibunda*-Populationen nahe der Universitätsstadt Uppsala in Schweden konnten sich nicht dauerhaft halten (EBENDAL 1979). Nur Populationen auf Bornholm (Dänemark), die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Aussetzungen zurückgehen (EBENDAL & UZZELL 1982, GÜNTHER 1990, SJÖRGEN 1991, FOG 1994), sind stabil (RYBACKI 1994) und bilden die unter menschlicher Mitwirkung erweiterte nordwestlichste Verbreitungsgrenze von *R. ridibunda*.

Sehr erfolgreich waren Ansiedlungen von Seefröschen in Italien (LANZA 1962). Die in Norditalien ausgesetzten, ursprünglich aus Albanien stammenden sieben Paare breiteten sich rasch aus und bildeten große Populationen, die auch zu Speisezwecken genutzt wurden. Aus Norditalien wiederum wurden Wasserfrösche (zusammen mit dem Ochsenfrosch) nach Spanien verbracht, die in der Umgebung einer aufgelösten Froschfarm mit autochthonen *R. perezi* Mischpopulationen bilden und sehr wahrscheinlich mit dieser auch hybridisieren (ARANO et al. 1995).

Nachdem im früheren Jugoslawien über Jahrzehnte hinweg Wasserfrösche zur Nahrungsmittelverarbeitung gefangen und exportiert wurden (in mehr als 70 Jahren über 100 Mio. Tiere), wurden allein im Jahr 1980 zur Wiederansiedlung und zu Bestandsstützungen in Bosnien und Herzegovina mehrere hunderttausend Wasserfrösche aus der ehemaligen Sowjetunion ausgesetzt (LJUBISAVLJEVIC et al. 2003).

In Frankreich werden Wasserfrösche seit langer Zeit zu kulinarischen Zwecken importiert (PAGANO et al. 2003). So wurden aus dem früheren Jugoslawien in den Jahren von 1928 bis 1976 mehr als 5000 Tonnen (ca. 142 Mio. Tiere) lebende Wasserfrösche eingeführt (LJUBISAVLJEVIC et al. 2003). Von diesen Importen konnten wahrscheinlich des Öfteren auch Tiere entkommen oder wurden absichtlich ausgesetzt, was dazu führte, dass in vielen Populationen neben mitteleuropäischen Genotypen auch Tiere nachgewiesen wurden, die charakteristische Allele türkischer und ägyptischer Wasserfrösche besaßen (PAGANO et al. 2003). In mehr als der Hälfte (54,5 %) aller untersuchten *R. ridibunda*-Populationen traten bei jeweils mindestens einem Tier Allele auf, die sonst nur bei Wasserfröschen der genannten Länder vorkommen. Insgesamt betrug der Anteil rein allochthoner Individuen 3,9 %, wobei auch Hybriden mit Merkmalen mitteleuropäischer und ostmediterraner Formen gefunden wurden.

Die wiederholten Aussetzungen werden auch als Grund dafür angesehen, dass *R. ridibunda* heute in vielen Teilen Frankreichs verbreitet ist, wobei nicht sicher ist, ob diese Gebiete zu ihrem ursprünglichen Areal zählen (PAGANO et al. 2001). Bisher wurden keine Marker analysiert, auf deren Basis die in Frankreich verbreiteten von den mitteleuropäischen *R. ridibunda* abgegrenzt werden können (abgesehen von den als allochthon erkannten). Die letztendliche Entscheidung, ob es neben den allochthonen *R. ridibunda* aus Südeuropa in Frankreich auch autochthone Seefrösche gibt, kann daher noch nicht getroffen werden. In Habitaten, die für den Seefrosch günstige Bedingungen bieten (sauerstoffreiche, größere Gewässer), stellt dieser eine starke Konkurrenz zu den dort ursprünglich vorkommenden Formen dar. Vermutlich werden die

autochthonen Wasserfrösche, *R. perezi* und *R. kl. grafi*, durch eingeschleppte *R. ridibunda* aus einigen Habitaten verdrängt (SCHMELLER et al. 2007).

Zur Besiedlung Südfrankreichs durch *R. ridibunda* hat vermutlich auch die in den letzten Jahren beobachtete rasante Ausbreitung allochthoner Seefrösche in der Schweiz beigetragen (PAGANO et al. 1997). In der Schweiz gehen alle stabilen Seefroschpopulationen auf Aussetzungen zurück (GROSSENBACHER 1988). Die dort nach wie vor zu kulinarischen Zwecken importierten Frösche stammen sowohl aus Südosteuropa als auch aus Anatolien. Zwischen 1920 und 1950 wurden wahrscheinlich ungarische Wasserfrösche ausgesetzt (WITTENBERG 2005). Die während der 60er- und 70er Jahre eingeführten Tiere stammten ebenfalls vor allem aus Ungarn, später aber auch aus südlicheren Staaten des Balkan, der Türkei und Ägypten (PAGANO et al. 2003, K. GROSSENBACHER, pers. Mitteilung). In der Schweiz finden sich heute an den Knotenpunkten des Importverkehrs allochthone Seefroschpopulationen.

Das Aussetzen allochthoner Tiere der *R. ridibunda*-Gruppe hat eine Verdrängung der einheimischen Wasserfroschpopulationen in der Schweiz ausgelöst. In diesem Prozess spielen auch die hybridogenetischen Reproduktionsmodi des Teichfrosches (*R. kl. esculenta*) eine Rolle (VORBURGER & REYER 2003). Autochthon kommt in der Schweiz nur die Hybridform *R. kl. esculenta* syntop mit *R. lessonae* vor (LE-System). Aus Paarungen zwischen den Hybriden und *R. lessonae* entstehen ausschließlich *R. kl. esculenta*. Mit der Verschleppung allochthoner *R. ridibunda* werden Seefroschgenome in die Populationen eingebracht, die die Stabilität der ursprünglichen Populationssysteme stören und eine rasche Verbreitung von *R. ridibunda* in den Populationen auslösen (VORBURGER & REYER 2003). Aus Kreuzungen zwischen allochthonen *R. ridibunda* und autochthonen *R. kl. esculenta* können, im Gegensatz zu natürlichen RE-Systemen in Mitteleuropa, *R. ridibunda*-Nachkommen hervorgehen.

Auch in Belgien wurden nach genetischen Untersuchungen (mt-DNA und Mikrosatelliten) in über der Hälfte (58,6 %) von 29 untersuchten *R. ridibunda*-Populationen Allele bzw. mt-Genotypen anatolischer Wasserfrösche nachgewiesen, die wahrscheinlich durch den Handel während der letzten Jahrzehnte eingeschleppt wurden (G. HOLSBEEK, Katholieke Universiteit Leuven, Belgien, pers. Mitteilung). KOK (2001) berichtete von Wasserfröschen, die aus dem Nahen Osten nach Belgien importiert wurden und dort im Einzelhandel für Teichanlagen angeboten wurden.

In den Niederlanden wurden 1971 durch eine Einzelperson bulgarische *R. ridibunda* ausgesetzt, die wahrscheinlich überlebten (HOOGMOED 1975). Darüber hinaus wurden Wasserfrösche auch in Luxemburg (GÜNTHER 1990, SCHMIDT & PROESS 2003) sowie Russland und Lettland (BORKIN et al. 2002) ausgesetzt.

Aussetzungen finden häufig aus Tierschutzgründen statt, so wie beispielsweise die Freilassung von Wasserfröschen, darunter auch bulgarischer *R. ridibunda*, durch einen Tierschutzverein in Plünderhausen (Deutschland), der 1982 die Tiere von der Universität Tübingen kaufte, um diese vor Tierversuchen zu retten (THURN et al. 1984).

Die zahlreichen Beispiele verdeutlichen, dass Wasserfroschpopulationen in vielen Teilen Europas durch ausgesetzte Tiere beeinflusst wurden bzw. werden. Da die Differenzierung zwischen autochthonen und allochthonen Wasserfroschformen, insbesondere innerhalb der Seefrosch-Gruppe und die Identifizierung von Hybriden die Anwendung molekularer Methoden erfordert, bleiben allochthone Individuen und Tiere mit allochthonen Genen in vielen Fällen unentdeckt (PLÖTNER 2005). Erst auf der Basis informativer, molekularer Marker (z. B. mt-DNA, hochvariable nukleäre Genomabschnitte) werden Aussagen über die Anteile allochthoner Wasserfrösche, deren Verbreitungswege und weiteren Bestandsentwicklungen möglich.

1.3.2 Allochthone Wasserfrösche in Deutschland

Die Ausbreitungsprozesse von allochthonen Seefröschen in der Schweiz lassen vermuten, dass diese auch Deutschland betreffen, da der Rhein selbst und mehrere mit ihm in Verbindung stehende Flüsse in der Schweiz entspringen. Neben dem Auftreten allochthoner Formen, die auf örtliche Aussetzungen zurückgehen, kann deshalb vor allem in den südwestlichen Bundesländern mit dem Vorkommen allochthoner Tiere gerechnet werden.

Die seit den 70er Jahren beobachtete Ausbreitung des Seefroschs in den rheinnahen Gebieten Baden-Württembergs zwischen Basel und Strassburg (SOWIG et al. 2007) kann wahrscheinlich durch eine weitergehende Ausbreitung der in der Schweiz eingeschleppten Wasserfrösche erklärt werden, zumal dieser Zusammenhang auch durch die Historie der Nachweise gestützt wird. Auch in den linksrheinischen Gebieten (Elsass) konnte eine Zunahme der bekannten Vorkommen in den letzten 25 Jahren (von 2 auf 38) verzeichnet werden (BUFO 2005). Zusätzlich wurden aus dem südwestdeutschen Raum eine Reihe örtlicher Aussetzungen bekannt (siehe SOWIG et al. 2007). Informationen über Herkunft, Daten und Zahl der verschleppten Tiere sowie den Gründen und das Schicksal der allochthonen Populationen sind nur bruchstückhaft.

Auch an anderen Stellen in Deutschland kann mit dem Einfluss allochthoner Wasserfrösche gerechnet werden. So wurden seit Gründung der Ruhr Universität Bochum in deren Umgebung wiederholt Wasserfrösche von Liebhabern als Exkursionsmitbringsel und Restexemplare von Lehrveranstaltungen ausgesetzt (T. KORDGES und B. KIRCHNER, ehem. Kustos des Botanischen Gartens der Ruhr Universität Bochum, pers. Mitteilungen). Gab es in dem angrenzenden Lottental vor den Aussetzungen keine Wasserfrösche, so entstammen die Tiere der heutigen Populationen dem westlichen Westfalen, vermutlich dem südlichen Balkan und eventuell noch weiteren Ursprungsgebieten. Auch die im Gegensatz zu anderen Amphibien beobachteten positiven Bestandentwicklungen bei Wasserfröschen im Ruhrtal gehen überwiegend auf Aussetzungen zurück (KORDGES 1988). SCHRÖER (1997) fand auf der Grundlage von Enzymelektrophoresen im Ruhrtal Allele, die in der Bundesrepublik und anderen mitteleuropäischen Untersuchungsgebieten noch nicht nachgewiesen werden konnten und schließt daraus, dass diese als nicht endemisch anzusehenden Enzymformen ursprünglich durch importierte Wasserfrösche in die einheimischen Populationen gelangt sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass über die erwähnten Fälle

hinaus eine Vielzahl weiterer Aussetzungen, vor allem in der Umgebung von Großstädten, aus unterschiedlichen Motiven heraus erfolgt sind (KORDGES 1988).

Zusammenfassend können folgende Gründe für die Aussetzung von Wasserfröschen genannt werden:

- durch Liebhaber und Enthusiasten, die Ökosysteme nach ihren Vorstellungen „gestalten“ möchten,
- als Restexemplare wissenschaftlicher Untersuchungen,
- Importe zu kulinarischen Zwecken (absichtlich oder unabsichtlich ausgesetzte Tiere),
- zur Wiederansiedlung und Bestandsstützung (u. a. Maßnahmen im Rahmen des Arten- und Naturschutzes).

1.3.3 Populationsgenetische Folgen von Verschleppungen

Bei der anthropogenen Translokation von Arten in Areale, die bisher nicht zu ihren Verbreitungsgebieten gehörten, kommt es meist zu einem ausgeprägten genetischen *bottleneck*-Effekt, da in der Regel nur wenige Exemplare einer Spezies in den neuen Lebensraum eingebracht werden. Allgemein wird angenommen, dass sich dies nachteilig auf die Neozoen-Population auswirkt, da der Verlust von genetischer Diversität die Anpassungsfähigkeit einer Population herabsetzen und die Anfälligkeit gegenüber Krankheiten erhöhen kann (SPENCER et al. 2000, HOLLAND 2001, SAKAI et al. 2001, MAUDET et al. 2002).

Diese Annahme konnte an heute noch existierenden Populationen von *R. ridibunda* in Südengland (Kent) überprüft werden, die auf die Aussetzung von zwölf aus Ungarn stammenden Tieren im Jahre 1935 zurückgehen (ZEISSET & BEEBEE 2003). Ausgehend von dieser geringen Individuenzahl, bildete der dort natürlicher Weise nicht vorkommende Seefrosch rasch große Populationen, aus denen 1973 wieder wenige Tiere entnommen und in weiter entfernten Landesteilen angesiedelt wurden. Die erneut umgesiedelten Tiere durchliefen also einen zweiten *bottleneck* innerhalb weniger Generationen. Molekularbiologische Untersuchungen (fünf Mikrosatelliten-Marker und RAPD) zeigten, dass die genetische Diversität innerhalb der südenglischen Populationen mit durchschnittlich 13 Allelen (bezogen auf alle fünf Loci) nur wenig geringer als in einer Referenzpopulation aus Ungarn war, in der 16 Allele nachgewiesen werden konnten. Innerhalb einer südenglischen Population lag die Variabilität mit 20 Allelen sogar höher als in der Referenzpopulation. Dieser demographische *bottleneck* bewirkte anscheinend nur eine geringe Reduzierung der genetischen Vielfalt, die auch die relative Fitness der Tiere nicht erkennbar beeinflusste, da verschiedene Parameter der Larvenentwicklung keine signifikanten Unterschiede zu Tieren aus Vergleichspopulationen zeigten (ZEISSET & BEEBEE 2003).

Allerdings kann von einer Korrelation der genetischen Diversität, wie sie an Hand von zufällig gewählten variablen Markern festgestellt wurde, mit der Fitness der Tiere nicht unbedingt ausgegangen werden, da die Fitness auch durch genetisch konservierte Faktoren bestimmt sein kann (ROWE & BEEBEE 2001).

Nach Beobachtungen in anderen Tiergruppen werden die Folgen eines *bottlenecks* durch ein rasches Populationswachstum nach Durchlaufen des *bottlenecks* vermindert (LE PAGE et al. 2000, TSUTSUI et al. 2000, BEEBEE & ROWE 2001, ZENGER et al. 2003), wie dies bei den *R. ridibunda*-Populationen erfolgte. Dabei wurde das schnelle Anwachsen der Seefroschpopulation durch die fehlende Konkurrenz bereits lokal angepasster Wasserfrösche begünstigt. Eine erfolgreiche Etablierung von *R. ridibunda*, ausgehend von wenigen Exemplaren, wie in Südengland, kann nach diesen Ergebnissen auch in anderen, bisher durch keine oder konkurrenzschwächere Wasserfroscharten besiedelte Habitate erwartet werden, sofern die ökologischen Ansprüche erfüllt sind.

Allochthone Wasserfrösche konkurrieren nicht nur mit einheimischen Tieren um Ressourcen, sie stellen auch aus genetischer Sicht einen ernstzunehmenden Gefährdungsfaktor dar. In den klimatisch sehr unterschiedlichen Regionen Europas kommen viele eng verwandte Wasserfroschformen vor, die untereinander kaum wirksame reproduktive Isolationsbarrieren entwickelt haben (KAWAMURA & NISHIOKA 1979, 1986, GÜNTHER 1982, BERGER et al. 1982, 1994). Aus Paarungen zwischen allochthonen und autochthonen Wasserfröschen gehen häufig fertile Bastarde hervor, die in der Lage sind, sich mit autochthonen Individuen rückzukreuzen. Die nur sehr schwach ausgeprägten prä- und postzygoten Isolationsmechanismen zwischen endemischen Wasserfröschen und eingeschleppten Tieren ermöglichen die Introgressionen allochthoner Gene in den endemischen Genpool. Werden Tiere in einheimische Populationen eingebracht, die Regionen mit abweichenden ökologischen Bedingungen entstammen, könnte es zur Bildung von Genotypen kommen, die nicht an die regionalen Verhältnisse adaptiert sind. Die Hybriden könnten aufgrund ihres hohen Heterozygotiegrades möglicherweise ökologisch besonders plastisch sein oder aber (unter mitteleuropäischen Klimaverhältnissen) im Vergleich zu einheimischen Formen eine reduzierte Fitness aufweisen. Wie das Beispiel des in Mitteleuropa weit verbreiteten Teichfrosches (*Rana* kl. *esculenta*) zeigt, besiedeln Hybriden mitunter ein breiteres Habitatspektrum und ein größeres Areal als ihre Elternarten (vgl. GÜNTHER 1990). Eventuell können vorerst auch keine Unterschiede in der Überlebensfähigkeit und Fortpflanzungsrate der Hybriden im Vergleich zu autochthonen Formen erkannt werden, da solche Auswirkungen vielleicht nur unter extremen klimatischen Bedingungen (z. B. strenge Winter) bei den genetisch veränderten Populationen eintreten.

1.4 Unterscheidung von Wasserfroscharten an Hand genetischer Merkmale

Eine besondere Schwierigkeit bei der Unterscheidung autochthoner von eingeschleppten Wasserfröschen liegt darin, dass die Ursprünge vieler allochthoner *R. ridibunda*-Formen in denselben Gebieten vermutet werden, aus denen auch die postglaziale Wiederbesiedlung Zentraleuropas erfolgte. Da die Trennung zwischen den in Zentraleuropa autochthonen

Populationen und ihren, in den glazialen Refugialräumen verbliebenen Ursprungspopulationen, erst vor ca. 10.000 Jahren und damit, stammesgeschichtlich gesehen vor relativ kurzer Zeit erfolgte (TABERLET et al. 1998, HEWITT 1999, ZEISSET & BEEBEE 2001), sind auch unter besonders variablen genetischen Markern kaum Polymorphismen zwischen diesen Populationen zu erwarten. Stammen die verschleppten Tiere hingegen nicht aus den refugialen Ursprungspopulationen, können genetische Merkmale klare Hinweise auf einen allochthonen Ursprung geben.

Erleichtert wird das Erkennen allochthoner Wasserfrösche durch eine geringere Vielfalt mitochondrialer Genotypen in den nacheiszeitlich besiedelten Gebieten Mittel- und Nordeuropas gegenüber den südeuropäischen Lebensräumen (siehe OHST 2001, PLÖTNER & OHST 2001, PLÖTNER et al. 2001). Analog dazu sollte, neben einer reduzierten Diversität, auch eine Verschiebung der Allelfrequenzen nukleärer Gene in den nördlichen Verbreitungsgebieten der Wasserfrösche gefunden werden. Folgende Kriterien können genutzt werden, um genetische Merkmale ursprünglich allochthoner von denen autochthoner Tiere unterscheiden zu können:

Phylogenetische Verwandtschaft

Die große Zahl genetisch differenzierbarer Linien innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe, vor allem in den südlichen Verbreitungsgebieten, ermöglicht es, viele eingeschleppte Wasserfrösche aus diesen Ursprungsregionen an Hand ihrer genetischen Merkmale zu identifizieren. Aus phylogenetischen Untersuchungen ist bekannt, dass auf Basis mitochondrialer DNA autochthone Tiere von allochthonen Formen in den angenommen Ursprungsgebieten (südlicher Balkan und Anatolien) unterschieden werden können (Abb. 2) (OHST 2001, PLÖTNER & OHST 2001).

Geographische Verteilung

Eine ungleichmäßige Verteilung der Genotypen kann auf anthropogene Mitwirkung bei der Besiedlung weit entfernter Gebiete hindeuten. Disjunkte Verbreitungen können aber auch bei Reliktpopulationen mit bestimmten genetischen Varianten auftreten, deren Abundanz sekundär eingeschränkt ist.

Häufigkeit

Verglichen mit der Größe autochthoner Zielpopulationen werden allochthone Wasserfrösche in relativ geringer Zahl ausgesetzt. Daher sollten allochthone Genomvarianten nur kleine Anteile am Genpool endemischer Populationen haben. Die Besiedlung zuvor froschfreier Habitate durch Allochthone, als auch die selektive Begünstigung allochthoner Allele, können allerdings die beobachteten gegenüber den erwarteten Häufigkeiten verschieben.

Genetische Vielfalt der Populationen

In Populationen, die durch allochthone Wasserfrösche beeinflusst werden, wird eine höhere genetische Vielfalt erwartet. Da die genetische Variabilität unter den Wasserfröschen innerhalb der angenommenen Ursprungsgebiete allochthoner Tiere deutlich höher ist als in Zentraleuropa, kann

davon ausgegangen werden, dass durch Verschleppungen die genetische Diversität in den betroffenen einheimischen Populationen deutlich ansteigt.

Diese Informationen können in erster Linie dazu dienen, jene Populationen zu identifizieren, in denen genetische Merkmale eingeschleppter Formen auftreten. Bei welchen Genotypen es sich im Einzelnen um eingeschleppte Varianten handelt, kann daraus noch nicht abgelesen werden.

Wenn die Einschleppungsereignisse allochthoner Individuen länger als eine Fortpflanzungsperiode zurückliegen, wie dies überwiegend erwartet werden kann, sollten die genetischen Merkmale der Allochthonen infolge von Hybridisierungen mit autochthonen Tieren, auch heterozygot in Kombination mit autochthonen Varianten nachgewiesen werden, wodurch die genetische Vielfalt weiter ansteigt.

1.5 Verbreitung der Amphibien-Chytridiomykose - welchen Anteil können allochthone Wasserfrösche haben?

Die Verschleppung von Tieren birgt generell die Gefahr, dass auch die Ausbreitung von Krankheitserregern beschleunigt oder gar erst ermöglicht wird (DASZAK et al. 2000, GARNER et al. 2006, NENTWIG 2007). Die erst vor wenigen Jahren beschriebene Chytridiomykose bei Amphibien (BERGER et al. 1998, LONGCORE et al. 1999) bietet die Möglichkeit, die Rolle allochthoner Wasserfrösche bei der Verbreitung von Krankheitserregern zu untersuchen. Als Auslöser der Chytridiomykose wurde der mikroskopische Pilz, *Batrachochytrium dendrobatidis*, identifiziert (Abb. 3). Bestandseinbrüche mit zum Teil dramatischen Massensterben in Amphibienpopulationen wurden in den letzten Jahren mit dem Vorkommen bzw. der Einschleppung dieses Krankheitserregers in Zusammenhang gebracht (MUTHS et al. 2003, LIPS et al. 2005, BERGER et al. 2004).

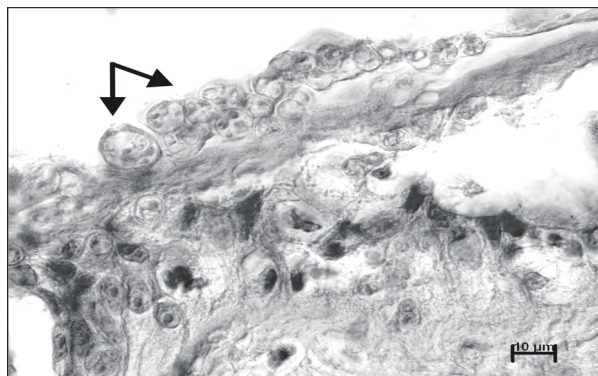


Abb. 3: Sporangien von *B. dendrobatidis* in der Epidermis eines infizierten Froschs (*Hyla cinerea*). Das Stratum corneum ist zerstört und abgelöst. Die Sporangien sind auf der obersten Schicht durch Pfeile markiert. (Foto: F. Mutschmann)

Der Erreger kann in der Natur bisher nur direkt auf der Haut befallener Amphibien (meist durch histologische- oder PCR-Techniken) anhand von Gewebeproben nachgewiesen werden.

Sollten in einheimischen Wasserfroschpopulationen, bei denen Einflüsse allochthoner Tiere festgestellt wurden, die Pilzerkrankung besonders häufig nachgewiesen werden, könnten ursächlich Zusammenhänge angenommen werden. Dabei könnte die Einschleppung des Krankheitserregers auf ausgesetzte Individuen zurückgehen, oder die Hybridbildungen und genetischen Introgressionen erhöhte Anfälligkeiten der betroffenen Populationen insgesamt bewirken. Da der Genotyp eines Individuums maßgeblich für die Reaktion auf einen infektiösen Erreger ist (z. B. SAGE et al. 1986, MOULIA 1999), ist zu vermuten, dass der amphibienpathogene Pilz auf Grund unterschiedlicher Anfälligkeiten (Prädispositionen) der Tiere in Hybrid- bzw. rein autochthonen Populationen unterschiedliche Häufigkeiten (Prävalenzen) erreicht.

Durch die Detektion der pilzspezifischen DNA in den Gewebeproben griechischer Wasserfrösche wurde der Erreger bereits in einem potentiellen Ursprungsgebiet der allochthonen Frösche nachgewiesen (OHST et al. 2006). Aus der geographischen Verteilung der Nachweise in Deutschland könnten Informationen gewonnen werden, ob der Pilz bei einheimischen Wasserfröschen ein ursprünglicher und schon lange vorhandener Krankheitserreger ist, oder *B. dendrobatidis* erst jüngst eingeschleppt wurde.

Chytridiomykose wurde schon in anderen Untersuchungen als Indikator für unterschiedliche Krankheitsresistenzen von Hybriden und deren parentalen Arten verwendet (PARRIS 2004). Hier zeigte sich, dass Hybriden zwischen *Rana shenocephala* und *R. blairi* im Zusammenhang mit der Infektion eine verlängerte Larvenphase und reduzierte Körpermassen zum Zeitpunkt der Metamorphose aufwiesen. Dagegen konnten bei infizierten und nicht infizierten Larven der Elternarten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

1.6 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der Untersuchungen lag in der Erfassung der genetischen Einflüsse allochthoner Wasserfrösche auf einheimische Wasserfroschpopulationen. Über die unter 1.3.2 dargelegten Hinweise hinaus war nicht bekannt, wie weit allochthone Individuen verbreitet sind bzw. in welchem Umfang allochthone Gene einheimische Wasserfroschpopulationen bereits infiltriert haben. Deshalb waren zum einen die Bestimmung der Anteile gebietsfremder Individuen und zum anderen Nachweise von Introgressionen allochthoner Gene in den Genpool endemischer Arten Schwerpunkte der Untersuchung. Um die Ursprungsgebiete allochthoner Wasserfrösche bestimmen zu können, war es erforderlich, eine große Zahl von Proben aus möglichst allen Teilen der Westpaläarktis genetisch zu analysieren. Auf der Grundlage von Kreuzungsexperimenten sollten Informationen über genetische Kompatibilitäten allochthoner und autochthoner Linien sowie der Vitalität verschiedener Kreuzungsvarianten gewonnen werden. Um einen eventuellen

Zusammenhang zwischen der Einschleppung von Wasserfröschen und dem Auftreten einer Infektionskrankheit (Chytridiomykose) zu untersuchen, wurden Nachweistests für den amphibienpathogenen Pilz *B. dendrobatidis* bei den untersuchten Tieren durchgeführt.

Zusammenfassend wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welchen quantitativen Anteil haben allochthone Individuen und Hybriden an den Populationen?
2. Sind Introgressionen allochthoner Gene bei einheimischen Individuen nachweisbar und falls ja, in welchem Umfang?
3. Woher stammen allochthone Wasserfrösche und wie erfolgte ihre Ausbreitung?
4. Wie groß ist die ökologische Plastizität von allochthonen Individuen und von F1-Hybriden im Vergleich zu autochthonen Fröschen unter naturnahen Bedingungen?
5. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Prävalenz der Chytridiomykose und dem Nachweis bzw. Anteil allochthoner Tiere oder bestimmter Genotypen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Probenmaterial

2.1.1 Ursprung der Proben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeproben von 907 Wasserfröschen, welche von insgesamt 189 Fundorten stammten, genetisch untersucht (Anhang 1). Die Hälfte aller Proben (49 %) wurde in Deutschland während der Jahre 2003 und 2004 gesammelt. Dabei wurden Proben von 45 Fundstellen entnommen, deren Zahl durch Hinzuziehen von älterem Sammlungsmaterial auf 54 Fundstellen in Deutschland erhöht werden konnte (Abb. 5). Umfangreiches Vergleichsmaterial aus großen Teilen der zentralen Westpaläarktis wurde von Museen und Kollegen zur Verfügung gestellt (Abb. 4 und 6). Da unter den Vergleichsproben die Analyse von Probenmaterial aus der Schweiz, Frankreich, Griechenland und der Türkei für die bearbeitete Fragestellung von hervorgehobener Bedeutung ist, liegt die überwiegende Zahl der Fundorte (85) in diesen Ländern. Weitere 50 Fundstellen liegen in anderen Teilen der westlichen Paläarktis.

Die in Deutschland gesammelten Proben stammen überwiegend aus Populationen, die entlang des Rheins, der Mosel und der Ruhr gefunden wurden (Abb. 5). Des Weiteren wurden Proben aus zwei Fischzuchtanlagen entnommen (Niemegk, Brandenburg und Ettenheim, Baden-Württemberg). Soweit möglich, wurden von den in Deutschland beprobten Wasserfroschpopulationen jeweils 10 - 15 Tiere untersucht. Die Struktur der Gewässer, an denen die untersuchten Populationen gefunden wurden, war sehr vielgestaltig (Anhang 1 und 2). Die weitaus größte Zahl der Tiere (ca. 80 %) wurde in Gewässern gefunden, die mit den Hauptströmen der genannten Flüsse in Verbindung standen. Es handelte sich vor allem um Auengewässer und stömungsberuhigte, vegetationsreiche Uferabschnitte.

Die Gewebeproben aus Deutschland stammten überwiegend von juvenilen Wasserfröschen, da diese leichter und damit in größerer Zahl auch am Tage gefangen werden konnten als adulte Exemplare. Bei juvenilen Exemplaren konnte der Phänotyp auf Grund der zu erwartenden hohen Fehlerquote unter feldbiologischen Bedingungen (PAGANO & JOLY 1999) nur in wenigen Fällen exakt bestimmt werden.

2.1.2 Entnahme der Proben und Extraktion der DNA

Die Gewebeproben der nicht aus Deutschland stammenden Tiere lagen überwiegend in Form von ethanolfixierten Phalangen vor. Proben aus musealen Sammlungen wurden alkoholkonvervierten Tieren aus der Oberschenkelmuskulatur entnommen.

Die DNA-Isolation aus ethanolfixiertem Gewebe erfolgte mit Hilfe eines DNA-Isolierungskits (DNeasyTM Tissue Kit, Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Entfernung des Alkohols wurden die Gewebeproben zuvor 8 - 12 Stunden gewässert. Nach der Isolation wurde die DNA in 150 µl H₂O bidest aufgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

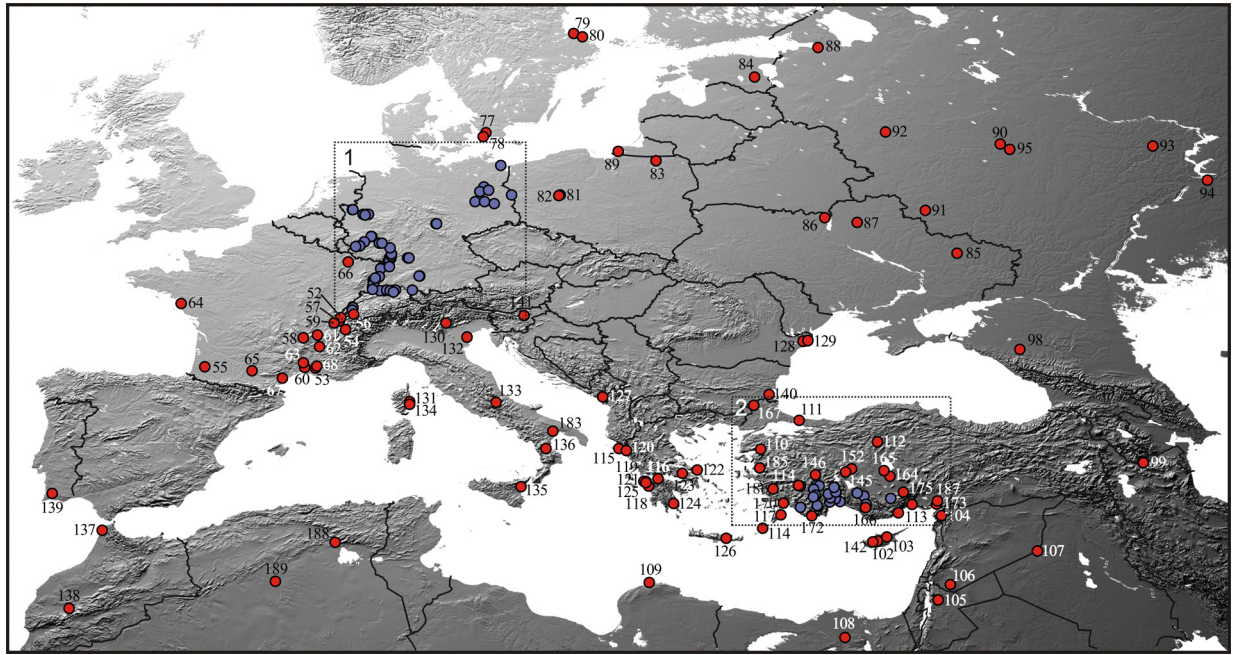


Abb. 4: Fundorte der Tiere, an denen genetische Untersuchungen durchgeführt wurden. Die blau markierten Fundorte sind auf separaten Karten dargestellt. Weitere Daten zu den Fundorten können Anhang 1 entnommen werden.

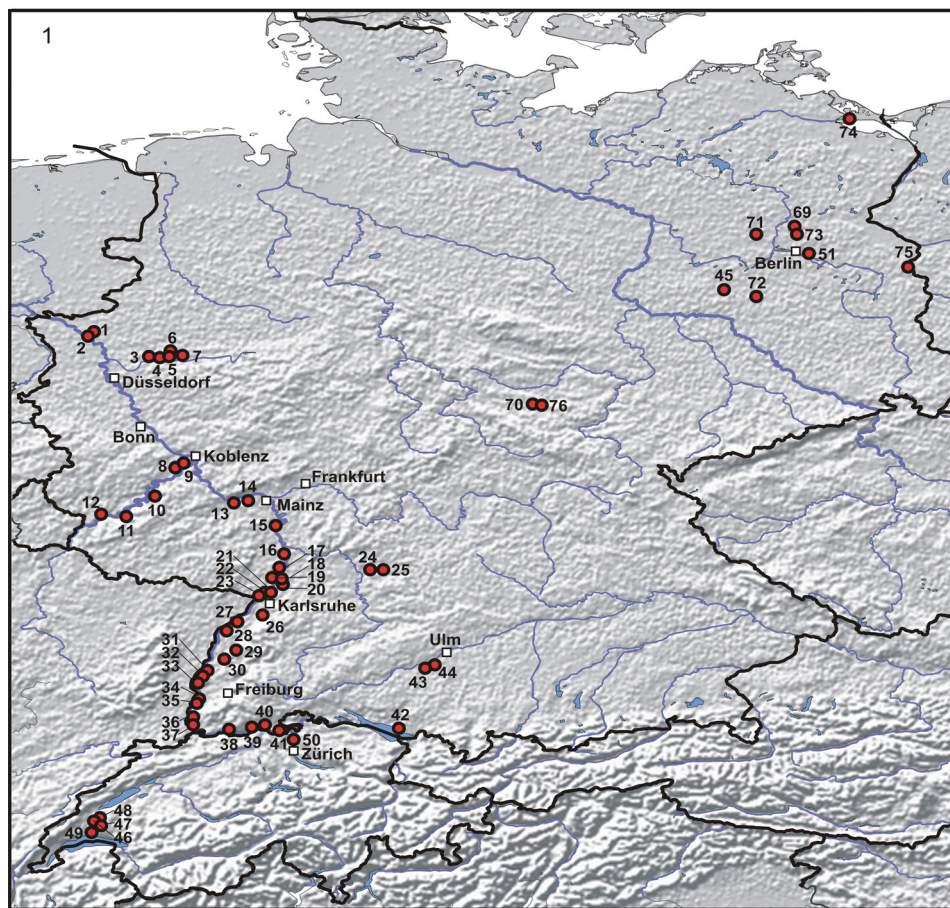


Abb. 5: Abb.: Fundorte der aus Deutschland stammenden Proben. Die Proben aus Ostdeutschland (Fundorte 69-76) stammen überwiegend von musealem Sammlungsmaterial.

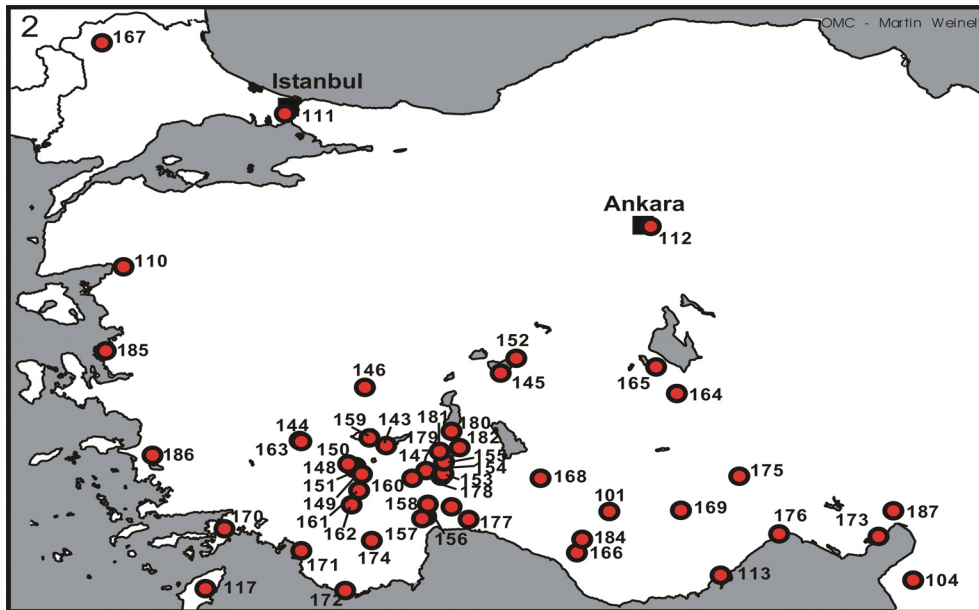


Abb. 6: Fundorte in Anatolien. Weitere Daten zu den Fundorten können Anhang 1 entnommen werden.

Von wenigen Tieren (12) lagen ausschließlich Blutproben vor, aus denen die DNA ebenfalls unter Verwendung des o. g. DNA-Isolierungskits gewonnen wurde.

Allen in Deutschland gesammelten Wasserfröschen wurden Mundschleimhautabstriche entnommen, um die Gewebeproben von den Tieren so schonend wie möglich zu erhalten. Dabei wurde mit Wattestäbchen (Ø 2 mm; Paul Hartmann AG, Heidenheim) den in der Hand fixierten Tieren bei mäßigem Druck ca. 10 Sekunden in der Mundhöhle entlang gerieben. Anschließend wurden die Spitzen der Wattestäbchen in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und die Stiele der Wattestäbchen kurz über dem Ende des mit Watte besetzten Teils abgebrochen, so dass die Eppendorfgefäße geschlossen werden konnten. Die weitere Aufarbeitung der Abstriche orientierte sich zunächst an der von OBERBAUER et al. (2003) beschriebenen Methode, wobei diese in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung eines DNA Isolations-Kit modifiziert wurde, um höher konzentrierte und reinere DNA-Isolate zu erhalten. In den Eppendorfgefäßen wurden jeweils 300 µl des Lysis-puffers AL aus dem DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen) vorgelegt, bevor die Spitzen der Wattestäbchen in die Eppendorfgefäße überführt wurden. Die weitere Bearbeitung der Mundschleimhautabstriche erfolgte mit dem gleichen DNA Isolations-Kit nach dem für tierisches Gewebe vorgesehenen Protokoll des Herstellers. Auf eine Behandlung mit Proteinase K wurde verzichtet, da die Mundschleimhautzellen schon ausreichend vereinzelt waren.

Für den Nachweis einer möglichen Infektion mit dem amphibienpathogenen Pilz *Batrachochytrium dendrobatidis* wurden zusätzlich Abstriche von der ventralen Oberhaut der Tiere gesammelt. Die Entnahme der Proben erfolgte mit leichten Veränderungen nach der von LIVO (2003) beschriebenen Methode. Bei jedem untersuchten Tier wurde mit einem Wattestäbchen ca. 25-mal auf der

ventralen Haut entlang gerieben und die Spitzen der Wattestäbchen in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, welche bereits 300 µl des Lysispuffers enthielten. Die weitere Aufarbeitung der Hautabstriche entsprach dem oben beschriebenen Verfahren. Der Reinheitsgrad der erhaltenen DNA aus den Hautabstrichen konnte durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt maßgeblich erhöht werden, wodurch die pilzspezifische DNA mit höherer Sensitivität (effizientere Amplifikation in den Test-PCR's) nachweisbar war. Daher wurden die meisten DNA-Proben aus den Hautabstrichen mit Hilfe eines Aufreinigungs-Kit (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2 Molekulare Datenerhebungen

2.2.1 Analysen der mitochondrialen DNA

Da die mitochondriale (mt) DNA unabhängig von der nukleären (n) DNA und fast ausschließlich maternal vererbt wird und darüber hinaus auch nur sehr selten Rekombinationen unterliegt, stellt der mt-Genotyp (= Haplotyp) einen eigenständigen und sehr informativen Merkmalskomplex dar (GRAY 1989). Als Marker für die Bestimmung der mt-Genotypen diente das mitochondriale ND3-Gen. Bei vorhergegangenen Untersuchungen konnte die Artzugehörigkeit bei Wasserfröschen auf der Grundlage des ND3-Gens in den meisten Fällen bestimmt werden (OHST 2001, PLÖTNER & OHST 2001 PLÖTNER et al. 2001). Die für die PCR-Reaktionen eingesetzten Primer, Reaktionsgemische und verwendeten Temperaturprofile sind in Tabelle 1 und 2 zusammengestellt. Der Erfolg der PCR's wurde mittels Gelelektrophoresen überprüft, wobei 5 µl jedes Reaktionsansatzes mit Gel-Ladepuffer vermischt auf ein 1,4-%iges Agarosegel aufgetragen wurden. Die Färbung der Agarosegele erfolgte mit Ethidiumbromid, um die aufgetrennten Fragmente auf einem UV-Leuchttisch (λ 312 nm) darstellen zu können. Vor den Sequenzierungsreaktionen mussten die überschüssigen Primer, Salze und Nukleotide aus den PCR-Reaktionen entfernt werden. Dies erfolgte durch Fällern und Waschen der verbliebenen 30 µl Reaktionsvolumina der amplifizierten DNA. Die fertig präparierten PCR-Produkte wurden bis zum Einsatz in den Sequenzierungsreaktionen bei -20°C gelagert.

Tab. 1: Sequenzen der verwendeten Primer. ^a Primer wurde in Länge und Sequenz modifiziert. Bd- *B. dendrobatidis* (Nachweistest).

Gen	Name	Primersequenz (5' → 3')	Referenz
ND3	ND3-L1	agt aca cgt gac ttc caa tc	MEYER et al. (1993) ^a
	ND3-H1	ttg agc cga aat caa ctg tc	MEYER et al. (1993) ^a
ITS2	ITS2-hin	gga tca ctc ggc tgc gtc gat gaa g	vorliegende Arbeit
	ITS2-rück	cgg gga ttc ggc gct ggg ctc ttc cc	vorliegende Arbeit
Bd-ITS1	ITS1-3Chytr	ccttgatataataacagtgtgccatgtgc	BOYLE et al. (2004)
	5.8S Chytr	agccaagagatccgttgtcaaa	BOYLE et al. (2004)

Tab. 2: Reaktionsgemische und Temperaturprofile der PCR's für die Amplifikation der ND3-, ITS2- und Bd-ITS1-Fragmente.

	ND3			ITS			Bd-ITS		
	Temp.	Zeit	Zyklen	Temp	Zeit	Zyklen	Temp.	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96°C	3'		96°C			95°C	5'	
Denaturierung	96°C	30''		96°C	30''		95°C	15''	
Annealing	50°C	30''	35	64°C	20''	45	60°C	30''	55
Extension	72°C	50''		72°C	50''		72°C	30''	
End-Extension	72°C	5'		72°C	5'		72°C	5'	

	PCR-Mix [µl]	PCR-Mix [µl]	PCR-Mix [µl]
10xPCR-Puffer	3,5	3,5	3,5
MgCl ₂ (50mM)	1	1	1
dNTP (50mM)	1	1	1
je Primer (10µM)	1	1	1
Polymerase (5U/µl)	0,2	0,25	0,25
Q-Solution (Qiagen)	-	7	-
H ₂ O bidest	ad 35	ad 35	ad 35

2.2.2 Analysen der nukleären DNA

Die Bestimmung der nukleären Genotypen erfolgte auf Grundlage der ITS2-Region (Internal Transcribed Spacer 2). Die ITS2-Region wurde als Kernmarker ausgewählt, da diese einen bekanntermaßen hochvariablen DNA-Abschnitt darstellt (z. B. FURLONG & MADEN 1983, GERBI 1986, SUMIDA et al. 2004), der flankiert ist von sehr konservierten Bereichen, die als Primerbindungsstellen in der PCR genutzt worden sind (Abb. 7). Die ITS2-Region ist Teil der ribosomalen Transkriptionseinheiten, welche in hoher Kopienzahl im Kerngenom vorliegen und für rRNA's als Bestandteile der Ribosomen kodieren (BROWN et al. 1972).

Sowohl bei der Amplifikation als auch bei den Sequenzierungsreaktionen der ITS2-Region ergaben sich massive Probleme, die wahrscheinlich durch Sekundärstrukturen (Schleifenbildungen eines DNA-Einzelstranges durch Selbstkomplementarität benachbarter DNA-Abschnitte) ausgelöst wurden. Das gesamte ITS2-Fragment der Wasserfrösche umfasst ca. 400 Basenpaare (Bp), wovon lediglich 30-40 Bp in den sequenzierten Fragmenten wieder gefunden werden konnten. Der Zusatz von Betain bzw. Q-Solution (Qiagen) stellte sich als entscheidend für eine weitestgehende Unterdrückung von Sekundärstrukturen in den PCR-Reaktionen heraus. Dennoch enthielten die ITS2 PCR-Produkte neben dem Zielfragment, welches die gesamte ITS2-Region umfasste, stets eine Vielzahl von Nebenbanden, die wahrscheinlich verschiedene, kürzere Anteile der ITS2-Region repräsentierten. Die Primer zur Amplifikation der ITS2-Region wurden so konstruiert, dass die Annealingtemperaturen in den PCR's vergleichsweise hoch gewählt werden konnten (je nach Gerät zwischen 64°C und 68°C). Dadurch sollte die Bildung von Sekundärstrukturen nach der Denaturierung zusätzlich eingeschränkt werden.

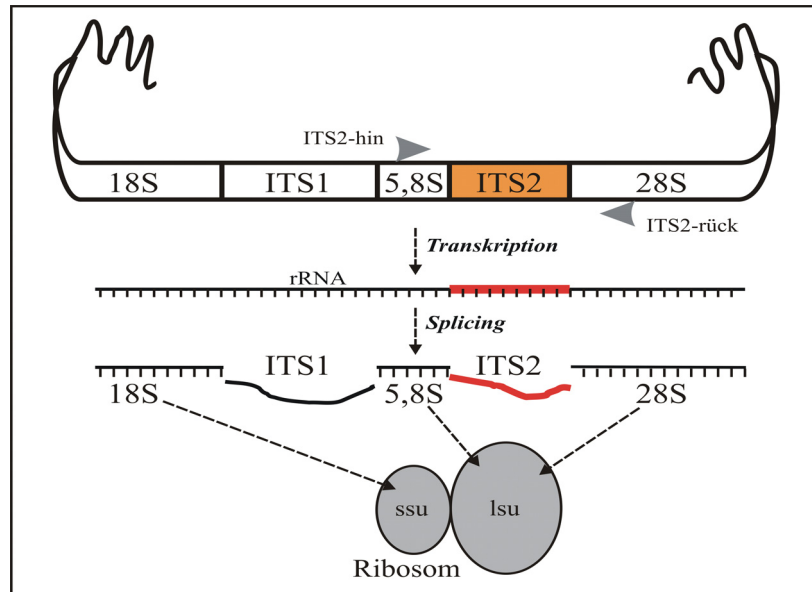


Abb. 7: Strukturmodell einer ribosomalen Transkriptionseinheit und Lage der Primer (graue Pfeile) zur Amplifizierung der ITS2-Region.

Trotz eines großen Überschuss des Zielfragments beeinträchtigten die Nebenprodukte aus der PCR die Lesbarkeit der Sequenzen stark und mussten daher vor den Sequenzierreaktionen entfernt werden. Dies erfolgte mittels einer präparativen Gelelektrophorese, wobei jeweils das gesamte PCR-Produkt auf ein 1,4-%iges Agarosegel aufgetragen wurde. Nach dem Gellauf konnten die Ethidiumbromid-gefärbten Fragmente aus dem Gel geschnitten werden. Die Extraktion der Zielfragmente aus den Agaroseblöcken erfolgte unter Verwendung eines Gel Extraktions-Kits (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Nach der Extraktion wurden die PCR-Produkte in 25 µl H₂O bidest aufgenommen und bei -20°C bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

2.2.3 Klonierung von PCR-Produkten

Die ITS2 PCR-Produkte von einigen heterozygoten Tieren, die also ein Gemisch aus zwei DNA Fragment-Typen unterschiedlicher Sequenz darstellen, wurden kloniert und konnten dadurch getrennt sequenziert werden (Abb. 8). Ein Teil der PCR-Fragmente wurde mit Hilfe eines Klonierungs-Kits (TOPO TA Cloning, Carlsbad, CA, USA) in Vektoren legiert. Als komplementäre Enden für die Ligation in den Vektor dienten die A-Überhänge, welche von der Taq-Polymerase während der PCR's an die Fragmente zusätzlich angefügt werden. Die Vektoren wurden dann in chemisch kompetente Zellen (TOP10F') transformiert, die ebenfalls in dem Klonierungs-Kit enthalten waren. Die Arbeitsschritte für die Ligation und Transformation folgten dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll. Nach Abschluss der Transformation wurden von jeder Reaktion 100 µl der Bakteriensuspension auf ein Nährmedium in Petrischalen ausplattiert und über Nacht (14-16 h) in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Nährmedium (LB: 15 g Bacto-agar, 10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extract und 10 g NaCl pro Liter H₂O bidest) enthielt

neben den für das Wachstum der Bakterien nötigen Substanzen auch ein Antibiotikum (Ampicillin, 50 µg/ml). Dadurch konnten nur Bakterienzellen zu Kolonien heranwachsen, bei denen die Transformation erfolgreich war, da der aufgenommene Vektor ein Gen für die Resistenz gegen Ampicillin enthielt (Amp⁺). Zur Vermeidung der unnötigen, weiteren Bearbeitung von Vektoren, die kein PCR-Fragment aufgenommen hatten (Selbstligation), wurde ein weiterer Selektionsschritt auf Basis des verwendeten Nährmediums eingefügt. Durch die im Nährmedium enthaltenen Substanzen (X-gal, 40 mg/ml und IPTG, 100 mM) war eine blau/weiß-Selektion der Kolonien möglich. Neben der Antibiotikaresistenz kodiert ein weiteres Gen des Vektors für den Abbau der Substanz X-gal (*lacZ* α). Das blau gefärbte Abbauprodukt von X-gal sammelt sich in den Bakterienkolonien an und ermöglicht so eine Unterscheidung von positiven (mit PCR-Fragment - weiß) und negativen Klonen (ohne PCR-Fragment - blau). Das IPTG kann die Aktivität des X-gal Gens als Induktor auslösen, wenn kein PCR-Produkt in den Vektor aufgenommen wurde.

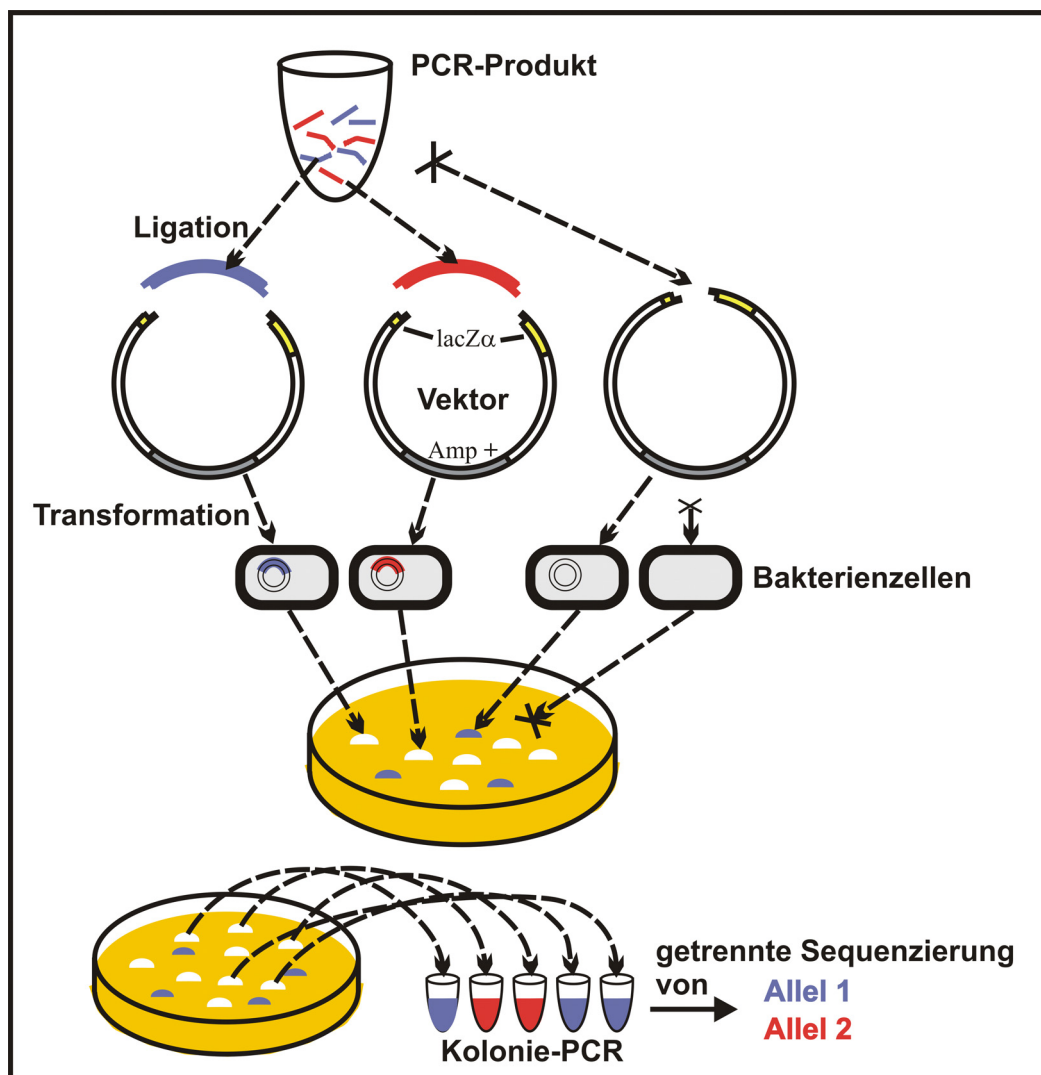


Abb. 8: Arbeitsschritte zum Klonieren der PCR-Produkte heterozygoter Individuen.

Wurde dagegen ein DNA-Fragment (PCR-Produkt) aufgenommen, liegt dies innerhalb des lacZ α -Gens (für den X-gal Abbau) und verhindert so die Bildung eines funktionsfähigen Enzyms zum Abbau des X-gals, wodurch die Bakterienkolonien ihre weiße Färbung behalten. Weiter bearbeitet wurden also nur die weiß gefärbten Kolonien (Kolonie-PCR). Das Mischungsverhältnis der beiden Allele eines heterozygoten Tieres in den PCR-Produkten sollte erwartungsgemäß 1:1 sein, so dass die Hälfte aller Kolonien das eine ITS2-Allel und die andere Hälfte das zweite ITS2-Allel enthalten. Generell wurden zuerst fünf Bakterienkolonien in getrennten PCR-Reaktionen eingesetzt, um jedes der beiden Allele einmal getrennt zu amplifizieren.

Die Petrischalen mit den Nährmedien wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert, so dass bei Bedarf weitere Kolonien genutzt werden konnten. Wenn im Ergebnis der Sequenzierungen nicht beide Allele eines Individuums durch die ersten fünf untersuchten Kolonien erfasst waren, wurden weitere fünf Kolonien bearbeitet.

Nachdem die Bakterienkolonien während der Inkubation zu etwa Stecknadelkopfgröße herangewachsen waren, wurden mit Hilfe von 200 µl Pipettenspitzen Teile des Kolonie-Materials direkt als Template in ein PCR-Gefäß überführt. Der PCR-Mix und das Temperaturprofil für die Kolonie-PCR's entsprachen denen für die ITS2-Region angegebenen (Tab. 2).

2.2.4 DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzierungen erfolgten nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (SANGER et al. 1977) mit Hilfe eines DNA-Sequenzierungs-Kits (Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, PE-Applied Biosystems, Weiterstadt). Der Gellauf und die Detektion der fluoreszierenden DNA-Banden wurden mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers, Modell ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer, USA) durchgeführt. Die Sequenzierung der ND3-Fragmente erfolgte auf der Grundlage von Standardprotokollen. In die Sequenzierungsreaktionen wurden 2-4 µl des gereinigten PCR-Produkts eingesetzt (Tab. 3).

Die Reaktionsbedingungen für die ITS2-Fragmente wurden im Vergleich zu den ND3-Fragmenten sowohl im Ansatz als auch im Temperaturprofil verändert. Trotz umfangreicher Versuche gelang es nicht, die komplette Sequenz der ITS2-Region zu bestimmen. Stabile Sekundärstrukturen waren aller Wahrscheinlichkeit nach die Ursache für die vorzeitigen Abbrüche während der Sequenzierreaktionen. Um die Bildung von Sekundärstrukturen möglichst zu unterdrücken, wurden den Sequenzierungsansätzen 20 % Q-Solution beigemischt und die Annealingtemperatur der Sequenz-PCR's auf 62°C erhöht. Versuche, bei denen die Annealingtemperatur auf maximal 68°C gesteigert wurden, erbrachten keine besseren Resultate. Auch nach weiteren Modifizierungen der Reaktionsbedingungen konnten letztendlich nur ca. 60 % der ITS2-Region sequenziert werden.

Tab. 3: Reaktionsgemische und Temperaturprofile der Sequenzierungsreaktionen für die ND3- und ITS2-Fragmente.

	ND3			ITS2		
	Temp.	Zeit	Zyklen	Temp.	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96°C	3'		96°C	3'	
Denaturierung	96°C	15''		96°C	15''	
Annealing	50°C	15''	35	62°C	15''	35
Extension	62°C	4'		62°C	4'	

	Sequenzieransatz [µl]	Sequenzieransatz [µl]
Sequenzierungs Kit	2	2
Primer (3,2 µM)	2	2
Q-Solution (Qiagen)	-	2
PCR-Produkt	2-4	2-4
H ₂ O bidest	ad 10	ad 10

2.3 Sequenzanalytik

Mittels der Computersoftware "Sequencing Analysis" (PE-Applied Biosystems, Weiterstadt) wurden die Basensequenzen aus den Fluoreszenzkurven ermittelt. Eine Überprüfung und eventuelle Korrektur der Sequenzrohdaten erfolgte visuell mit Hilfe des Computerprogramms "Sequence Navigator" (PE-Applied Biosystems, Weiterstadt).

Da sowohl für das ND3-Gen als auch für die ITS2-Region nur die Sequenz eines DNA-Stranges bestimmt wurde (mit wenigen Ausnahmen), sind nur die klar lesbaren Abschnitte für die weiteren Analysen verwendet worden.

2.3.1 Bestimmung der Allele bei heterozygoten ITS2-Genotypen

Die Sequenzsignale der ITS2-Regionen heterozygoter Tiere (mit zwei verschiedenen ITS2-Allelen) zeigten an vielen Positionen je zwei verschiedene Basen. Besonders schwierig ist die Identifizierung der heterozygot vorliegenden ITS2-Allele, wenn sich diese voneinander durch Baseninsertionen bzw. -deletionen (Indels) unterscheiden, da dann der gesamte Sequenzabschnitt, von der Position des Längenpolymorphismus an, überlagerte Sequenzsignale aufweist. Die Bestimmung der heterozygoten ITS2-Allele ist auf zwei Wegen erreichbar. Zum einen kann an Hand der überlagerten Sequenzsignale auf die Allelkombination geschlossen werden, die den Genotyp eines heterozygoten Tieres bilden (CLARK 1990). Dazu müssen möglichst viele Allele der untersuchten Organismen in homozygoter Form bekannt sein. Dies kann erreicht werden, indem die Zahl der untersuchten Proben aus einer bestimmten Region soweit erhöht wird, bis jedes im Probensatz auftretende Allel mindestens einmal in homozygoter Kombination gefunden wurde. Bedingt durch die Größe des in dieser Arbeit untersuchten Gebietes, waren nicht aus allen Regionen Proben in ausreichender Zahl verfügbar. Außerdem erfordert diese Vorgehensweise einen erheblichen Mehraufwand, der bei sehr seltenen Allelen

bzw. Allelen, die mit einem Letalfaktor gekoppelt sind, unter Umständen trotzdem nicht dazu führt, dass alle Varianten in homozygoter Form gefunden werden.

Eine andere Möglichkeit stellt die Trennung der ITS2 PCR-Produkte heterozygoter Individuen durch Klonierung dar, was auch in der vorliegenden Untersuchung vielfach genutzt wurde (vgl. 2.2.3).

2.3.2 Auswertung der Sequenzdaten heterozygoter Tiere

Auf Grund der Vielzahl heterozygoter Tiere war es nur zum Teil möglich, die ITS2-Allele zu klonieren und anschließend getrennt zu sequenzieren. Die Bestimmung vieler ITS2-Allele von heterozygoten Tieren erfolgte deshalb direkt aus den Elektropherogrammen. Obwohl spezielle Computerprogramme zum Erkennen der Allele in den Sequenzsignalen heterozygoter Individuen entwickelt wurden (z. B. PolyPhred, BHANGALE et al. 2006), erfolgten die Bestimmungen ausschließlich manuell, da schwankende Signalstärken sowie das gleichzeitige Auftreten von Längenpolymorphismen und Basensubstitutionen eine automatische Auswertung erschwerten. Zudem muss immer mit dem Vorkommen weiterer, bis dahin nicht homozygot gefundener Allele in den Sequenzsignalen heterozygoter Individuen gerechnet werden. Für die manuelle Bestimmung der ITS2-Allele aus den überlagerten Sequenzen heterozygoter Tiere wurde eine Datenbank erstellt, die die Sequenzen aller bekannten Allele enthielt. Mit Hilfe des Programms „MEGA“ Version 3.1 (KUMAR et al. 2004) wurde daraus eine Darstellung erzeugt, in der die Sequenzen aller ITS2-Allele ohne hinzugefügte Gaps übereinander lagen, wodurch nicht die homologen Positionen, sondern die Positionen gleichen Abstands von der Primerbindungsstelle untereinander dargestellt waren. Dadurch konnten die Sequenzen der verschiedenen Allele betrachtet werden, bis die Kombination gefunden war, die dem Muster der überlagerten Sequenzsignale für jede Position entsprach. Während der Bestimmungen wurden die Elektropherogramme durch das Programm „Chromas“ parallel zu den Sequenzdaten sichtbar gemacht (Abb. 9). Folgende Aspekte lassen diese Vorgehensweise als ausreichend zuverlässig erscheinen:

1. Primär stützt sich diese Methode auf das Prinzip der sparsamsten Erklärung. Wenn ein bestimmtes Sequenzmuster ohne alternative Varianten aus bekannten Allelen erklärt werden kann, sollte diese auch als wahrscheinlichste Erklärung für die Beobachtung herangezogen werden. Eine weitgehende Kenntnis der Gesamtvariabilität der untersuchten Proben und der damit in Betracht kommenden Varianten, erhöht die Zuverlässigkeit dabei erheblich.
2. Die gefundenen Allelkombinationen in den Populationen unterstützen die erfolgten Bestimmungen, da die bei einzelnen Tieren homozygot vorliegenden Allele innerhalb derselben Population erwartungsgemäß auch in heterozygoter Form gefunden wurden.
3. Die Zuverlässigkeit der Bestimmungen konnte an Hand der durchgeführten Klonierungen überprüft werden.

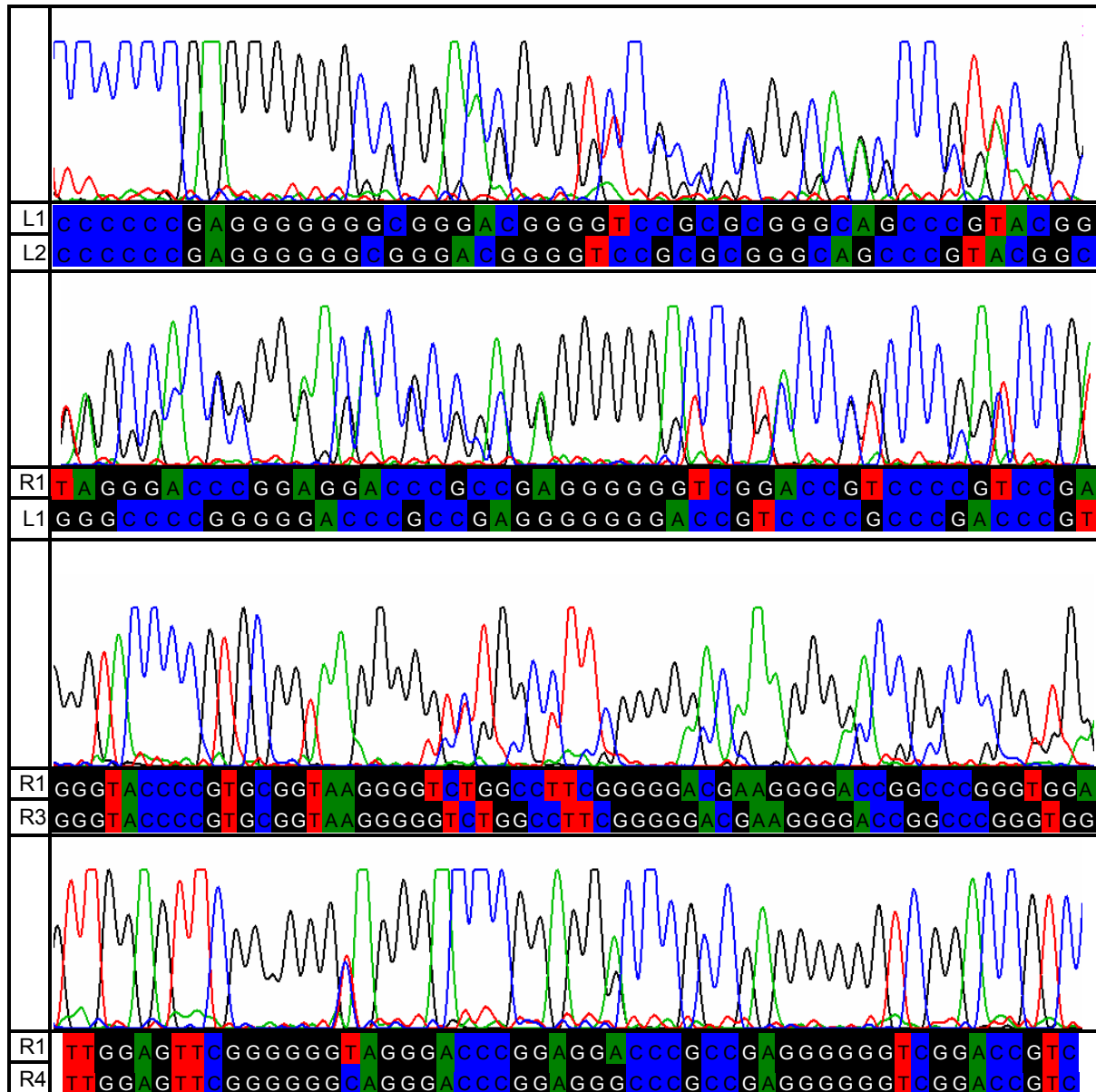


Abb. 9: Beispiele für die Bestimmung von ITS2-Genotypen bei heterozygoten Individuen. Die Signalstärken werden an Positionen mit verschiedenen Basen geteilt, aber auch durch die Basenfolge in der Umgebung mit beeinflusst (Alphey 1998).

Nach CLARK (1990) und CLARK et al. (1998) können auch Sequenzen von Allelen bestimmt werden, indem diese aus Sequenzsignalen heterozygoter Individuen herausgelesen werden, wenn die Sequenz nur eines der heterozygot auftretenden Allele bekannt ist. Auf diese Möglichkeit zur Identifizierung von Allelen wurde jedoch bis auf eine Ausnahme verzichtet. Diese Ausnahme bildete ein sehr häufiges Allel, das ausschließlich heterozygot auftrat. Zu zwei bekannten Allelen wies dessen Sequenz jeweils nur eine Substitution auf, wodurch eine eindeutige Bestimmung auch aus den überlagerten Signalen möglich war.

2.3.3 Berechnungen von Sekundärstrukturen der ITS2-Region

Der ITS2-Sekundärstruktur kommt eine hohe funktionelle Bedeutung zu, was auch dadurch deutlich wird, dass gemeinsame Grundstrukturen in den Faltungsmustern innerhalb phylogenetischer Großgruppen (Eukaryoten) gefunden werden können (SCHULTZ et al. 2005). Die funktionelle Bedeutung wurde auch durch in vivo Mutationsversuche an Hefen (*Sacchomyces cerevisiae*) gezeigt, da schon das Entfernen einzelner Nukleotide die Produktion der ribosomalen RNA verringerte oder stoppte (VAN NUES et al. 1995). Die konkrete Rolle der ITS2 und der Sekundärstrukturbildungen bei der Reifung der ribosomalen RNA wurden bisher aber noch nicht vollständig verstanden (HLINKA et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit dienen die Informationen zur Sekundärstruktur einer möglichen Optimierung des Alignments. Weiterhin konnten dadurch mögliche Ursachen für die Sequenzierprobleme erkannt werden. Die Faltungsstrukturen wurden mit Hilfe des Programms mFOLD (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi) (ZUCKER et al. 1999) berechnet. Das Programm wählt unter allen möglichen Faltungsstrukturen diejenigen aus, für deren Bildung die geringste freie Energie nötig ist.

2.4 Abschätzung des Homoplasiegehalts im Datensatz

Unter Homoplasien werden Parallelismen bzw. Konvergenzen und Rückmutationen als unabhängige Ereignisse in separaten Evolutionslinien zusammengefasst. Homoplasien führen zu Widersprüchen (Inkongruenzen) in der Merkmalsverteilung. Um Aussagen über die Zuverlässigkeit der aufgestellten Verwandtschaftshypothesen treffen zu können, erfolgte die Abschätzungen des Homoplasiegehaltes auf Grundlage folgender Methoden.

2.4.1 Anteil der Transitionen

Transitionen (Ts) (A↔G, T↔C) und Transversionen (Tv) T↔G, T↔A, A↔C, G↔C) akkumulieren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, da die Häufigkeiten beider Substitutionstypen verschieden sind. Obwohl es doppelt so viele Möglichkeiten für Transversionen gegenüber Transitionen gibt, treten Transitionen auf Grund biochemischer Eigenschaften der Nukleotide in den meisten Genen bevorzugt auf (WÄGELE 2000, KNOOP & MÜLLER 2006). Die Anteile beider Substitutionstypen unterscheiden sich bis zum Erreichen eines genspezifischen Sättigungswertes. Diese Erkenntnis kann zur Abschätzung der Zahl tatsächlich erfolgter, gegenüber den sichtbaren Substitutionen genutzt werden. Je weiter die Anteile der Transitionen und Transversionen von einem Sättigungswert entfernt sind, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit von Mehrfachtauschen an bestimmten Positionen. Zur Abschätzung des Homoplasiegehaltes wird der Quotient (HI) aus der Zahl der Transitionen und der Gesamtzahl beobachteter Substitutionen in den paarweisen Sequenzvergleichen gebildet ($HI = Ts / (Ts + Tv)$). Werte für $HI \geq 0,7$ gelten als Hinweis für einen geringen Homoplasieanteil im Datensatz (PRÜSER 1996). Die Werte wurden für alle paarweisen Sequenzvergleiche innerhalb des ND3- und ITS2-Datensatzes gebildet.

2.4.2 Konsistenz- und Retentions-Index

Im Rahmen von Parsimonieanalysen zur Rekonstruktion von Stammbäumen wurden die Konsistenz- (CI) und Retentions-Indizes (RI) der Datensätze bestimmt. Ist ein Datensatz frei von Homoplasien, würde jede Merkmalstransformation (Substitution) innerhalb einer Topologie an nur einem Knoten auftreten (bei korrekter Topologie). Wird dieselbe Merkmalstransformation in einer Topologie mehrfach angenommen, kann dies nur durch Konvergenzen oder Rückmutationen erklärt werden. Der Konsistenz-Index einer Topologie wird berechnet als $CI = M / S$, mit M als: theoretisch kleinstmögliche Schrittzahl (Summe der Merkmalszustände für jede Position - Zahl der Positionen) und S als: Anzahl der tatsächlichen Schritte (Länge eines Maximum-Parsimonie Stammbaums bei gleicher Wichtung aller Merkmale). Da Autapomorphien den CI künstlich erhöhen, diese aber keine Parsimonie-informativen Merkmale darstellen, ist die Aussagekraft des Indexes eingeschränkt.

Der Retentions-Index dagegen ist unabhängig von der Zahl der Autapomorphien, erfordert aber zusätzlich die Bestimmung der größtmöglichen Schrittzahl (G) zur Erklärung einer Merkmalsverteilung. Dazu wird für jede Position der Zustand als plesiomorph angenommen, welcher dort am häufigsten auftritt und die nötigen Transformationsschritte dann ohne die Annahme von Synapomorphien ermittelt. Der Retentions-Index wird berechnet als: $(G-S) / (G-M)$.

2.4.3 Bootstrap-Test

Mit einem Bootstrap-Test (FELSENSTEIN 1985) wird die Robustheit der Verzweigungen eines Stammbaumes abgeschätzt. Der Test liefert für jeden Gabelpunkt einen Wert, der ein Maß dafür ist, wie gut die Merkmale eines Datensatzes einzelne Verzweigungen einer Topologie stützen. Beim Bootstrap-Verfahren werden so viele einzelne Merkmale in zufälliger Reihenfolge aus dem ursprünglichen Datensatz entnommen, bis ein neu zusammengestellter Datensatz gleicher Länge entstanden ist. Dabei können Teile des ursprünglichen Datensatzes mehrfach übernommen werden, andere dagegen bleiben unberücksichtigt. Der neue Datensatz wird dann mit Hilfe eines Stammbaumrekonstruktionsverfahrens analysiert. Der Prozess der Neustrukturierung und Analyse wird mehrfach wiederholt, in der vorliegenden Arbeit umfassten die Bootstrap-Analysen 1000 Replikationen. Die im Ergebnis jeder Stammbaumrekonstruktion entstehenden Gruppierungen werden gespeichert und dann zu einem Konsensus-Stammbaum zusammengefasst. Die Häufigkeiten, mit der die Verzweigungen in den Topologien aus den umstrukturierten Datensätzen auftreten, werden als prozentuale Werte in den Konsensus-Stammbaum eingetragen.

Ein hoher Homoplasiegehalt reduziert die erhaltenen Bootstrapwerte, da auch viele alternative Gruppierungen in den Rekonstruktionen gefunden werden. FELSENSTEIN (1985) gibt an, dass drei kongruente (widerspruchsfreie) Merkmale ausreichen, um Bootstrap-Werte von 95 % zu erreichen.

2.5 Erstellung der Alignments und Stammbaumrekonstruktion

Die Erstellung eines Alignments führt im Sequenzenvergleich zur Bestimmung der homologen Basenpositionen, wodurch die Voraussetzung für phylogenetische Analysen geschaffen wird. Bei dem Vergleich von DNA-Sequenzen können grundsätzlich vier mögliche Arten von Sequenzdivergenzen unterschieden werden. Neben den als Basensubstitutionen bezeichneten Transitionen und Transversionen (siehe Abschnitt 2.4), können Insertionen (zusätzliches Einfügen von Basen) und Deletionen (Verluste von Basen) auftreten. Die letzten beiden Substitutionstypen führen zu Längenpolymorphismen und erfordern das Einfügen von Gaps (Leerstellen) in die DNA-Sequenzen, um beim Alignieren die homologen Positionen des gesamten Sequenzabschnitts festlegen zu können. Bei der hier untersuchten, nicht proteinkodierenden ITS2-Region, kann es in Bezug auf die Zahl, Positionierung und Ausdehnung der Gaps, je nach Gewichtung gegenüber den Basensubstitutionen, unterschiedliche Lösungen geben. Die Alignments wurden unter Zuhilfenahme des Programms „Sequenz Navigator“ Version 1.0.1, die Stammbaumhypothesen mit Hilfe der Programme „MEGA“, Version 3.1 (KUMAR et al. 2004), „PAUP 4.0b10“ (SWOFFORD 2003) und „Treefinder“ (JOBB 2007) erstellt.

Die Rekonstruktion von Stammbäumen diente in dieser Arbeit vor allem der Zuordnung allochthoner Linien zu bestimmten Verwandtschaftsgruppen innerhalb der westpaläarktischen Wasserfrösche und zur Bestimmung ihres geographischen Ursprungs. Für die Stammbaumrekonstruktion wurden mit dem Maximum Likelihood (ML) und dem Maximum Parsimonie-Verfahren (MP) zwei verschiedene Methoden vergleichend angewendet.

Für Stammbaumrekonstruktionen auf Basis der ITS2-Allele war vor allem die Bewertung der Gaps entscheidend. Auf Grund ihres hohen Anteils hätte das Ignorieren der Längenpolymorphismen große Informationsverluste bedeutet. Auch wenn der Stellenwert von Gaps gegenüber Basenaustauschen nicht eindeutig definiert werden kann, sind sie trotzdem als phylogenetisch informativ anzusehen, da diese durch Mutationsereignisse mit bestimmten Wahrscheinlichkeiten entstehen (GIRIBET & WHEELER 1999). Da die Akkumulation von Basensubstitutionen und Insertionen/Deletionen ihre Ursachen in denselben stammesgeschichtlichen Ereignissen haben und folglich dieselben phylogenetischen Informationen enthalten, wurden die Gaps in dem Datensatz belassen. Die dadurch erhaltene höhere Zahl von Merkmalen erzeugte robustere und besser aufgelöste Stammbäume.

2.5.1 Maximum Likelihood-Verfahren

Das ML-Verfahren hat zum Ziel, den Stammbaum zu finden, der am wahrscheinlichsten die Verwandtschaft der untersuchten taxonomischen Einheiten (Gensequenzen) wiedergibt. Für die Berechnungen wird eine Substitutionsmatrix erstellt, welche die Wahrscheinlichkeiten für die Transformationen zwischen den Merkmalszuständen (Nukleotide) angibt. Die Wahrscheinlichkeiten für die Transformation jedes Nukleotids in jedes andere können, je nach gewähltem Substitutionsmodell, verschieden sein. Bei der Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer

Merkmalstransformation innerhalb einer Topologie werden alle möglichen Übergangsformen bei der Transformation berücksichtigt, aus denen sich die Gesamtwahrscheinlichkeit für die Übereinstimmung einer Topologie mit der Verteilung der Einzelmerkmale ergibt. Die Summe aus den Einzelwahrscheinlichkeiten aller nötigen Merkmalstransformationen für die untersuchte Topologie bildet dann ein Maß für die Übereinstimmung des gesamten Datensatzes mit einer gewählten Topologie.

Um den ITS2-Datensatz unter Anwendung des ML-Verfahren analysieren zu können, wurden die Alignmentgaps durch Basen aufgefüllt. Dabei wurden die Basen für jedes ersetzte Gap so gewählt, dass bei paarweisen Sequenzvergleichen an den betreffenden Positionen anstelle von Indels nun Basenaustausche vorlagen. Gaps werden damit, ähnlich wie dies bei dem Parsimonie-Verfahren möglich ist, als zusätzliche (fünfte) Base gewertet. Diese Vorgehensweise schränkte allerdings die anwendbaren Sequenzevolutionsmodelle erheblich ein, da nur solche Modelle verwendet werden konnten, die keine unterschiedlichen Substitutionswahrscheinlichkeiten für verschiedene Typen von Basenaustauschen annehmen. Daher wurde ausschließlich das Jukes-Cantor-Modell (JUKES & CANTOR 1969) der Sequenzevolution eingesetzt, da dies keine Unterschiede hinsichtlich der Substitutionstypen und Basenhäufigkeiten annimmt.

Im Falle des ND3-Gens wurde das dem Datensatz am besten entsprechende Sequenzevolutionsmodell mit Hilfe des Programms „MODELTEST“ 3.7 (POSADA & CRANDALL 1998) ermittelt.

Stammbaumberechnungen und Bootstrap-Tests, die auf dem ML-Verfahren basieren, wurden mit Hilfe des Programms „Treefinder“ (JOBB 2007) durchgeführt.

2.5.2 Maximum Parsimonie-Verfahren

Dieses Verfahren basiert auf der Suche nach dem Stammbaum, für den die Summe aller Merkmalsänderungen am kleinsten ist (Prinzip der sparsamsten Erklärung). Auf der Suche nach der kürzesten (sparsamsten) Topologie werden die Merkmale (Positionen im Alignment) einzeln betrachtet und die Zahl der Merkmalstransformationen für jede Position ermittelt, die in der gerade untersuchten Topologie nötig sind, um deren Verteilung bei den terminalen Taxa zu erklären. Die Summe der Merkmalsänderungen für alle Positionen gilt dann als Gesamtlänge des MP-Stammbaums. Gibt es mehrere, gleich sparsame (kürzeste) Topologien, stellen sie gleichwertige phylogenetische Hypothesen dar. Diese können in einem Konsensusbaum zusammengefasst werden, der nur die Verzweigungen als Dichotomien aufrechterhält, die bei allen gleich sparsamen Topologien auftreten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Merkmale des Datensatzes sowohl ungewichtet als auch gewichtet eingesetzt. Bei der Wichtung der Merkmale wurde die Methode des „total fit“ eingesetzt (GOLOBOFF 1993). Dabei werden für jede Position Homoplasiewerte auf Grundlage der zufällig gewählten Topologien ermittelt. Je häufiger Merkmalsänderungen in einer gewählten Topologie unabhängig auftreten (inkongruente Merkmale), desto niedriger werden die Homoplasiewerte dieser Merkmale und der Gesamtwert für die Topologie sinkt. Bevorzugt wird jene Topologie,

welche den höchsten Gesamtwert aus den einzelnen Homoplasiewerten der Merkmale aufweist. Dies muss nicht unbedingt die kürzest mögliche Topologie sein (GOLOBOFF 1995). Bei dieser Art der Wichtung werden ohne zusätzliche Annahmen die Positionen abgewertet, die von vielen Homoplasien betroffen sind, wodurch die Zahl der Topologien mit gleich guten Werten gegenüber Analysen ohne Wichtungen deutlich sinkt. Das Maß, mit dem von Mehrfach austauschen betroffene Positionen abgewertet werden, wird aus den Daten individuell für jede Position ermittelt und kann durch eine Variable in der entsprechenden Funktion zur Berechnung der Homoplasiewerte festgelegt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Alignmentgaps bei Maximum Parsimonie-Analysen stets als fünfte Base definiert.

Auf dem MP-Verfahren basierende Stammbaumberechnungen und Bootstrap-Tests erfolgten mit Hilfe der Programme „MEGA“, Version 3.1 (KUMAR et al. 2004) und „PAUP 4.0b10“ (SWOFFORD 2003).

2.6 Populationsgenetik

Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts können erwartete Häufigkeitsverteilungen homo- und heterozygoter Genotypen in Populationen berechnet werden. Dieses theoretische Modell kann für diploide Organismen mit zweigeschlechtlicher Fortpflanzung und diskreten Generationen angewendet werden. Darüber hinaus ist es an eine Reihe weiterer theoretischer Bedingungen geknüpft. Dazu zählt, dass die Populationen unendlich groß sind sowie ausschließlich Zufallspaarungen, keine Migrationen, keine Selektion und keine Mutationen auftreten.

Für reale Populationen sind meist nur wenige dieser Bedingungen erfüllt. Trotzdem wird das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht häufig in der Populationsgenetik angewandt, da Abweichungen von den erwarteten Häufigkeiten erkennen lassen, dass zumindest eine der Voraussetzungen nicht erfüllt ist, was einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen darstellt (COCKBURN 1995).

In der vorliegenden Arbeit diente das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zur Berechnung der erwarteten Häufigkeiten von ITS2-Allelkombinationen in den Populationen, die nach folgender Formel erfolgen:

$$p_{AA}^2 + 2p_Aq_a + q_{aa}^2 = 1$$

p_{AA}^2 : Häufigkeit homozygoter A-Genotypen

q_{aa}^2 : Häufigkeit homozygoter a-Genotypen

$2p_Aq_a$: Häufigkeit heterozygoter Aa-Genotypen

Wenn mehr als zwei Allele in einer Population vorkommen, wird die Gleichung um zusätzliche Terme erweitert: $(p_A + q_a + r_y \dots n\text{-tes Allel})^2 = 1$.

Durch Anwendung des χ^2 -Anpassungstests konnten die Erwartungswerte der Allelhäufigkeiten in den Populationen mit den beobachteten Werten verglichen und die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) bei Ablehnung der Nullhypothese (die gefunden Allelkombinationen entsprechen nicht dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) ermittelt werden. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms „GENEPOP“, Version 3.3 (RAYMOND & ROUSSET 1995) durchgeführt.

Ebenfalls unter Anwendung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts wurden die Erwartungswerte für die Zahl der homozygoten Individuen eines jeden ITS2-Allels für alle Populationen in Deutschland berechnet und in einem χ^2 -Anpassungstests mit den beobachteten Werten verglichen.

2.7 Vergleichende ökologische Untersuchungen

2.7.1 Kreuzungen und Aufzucht der Larven

Für die Aufzuchtsexperimente wurden Nachkommen zwischen Seefröschen (*R. ridibunda*) aus einer Population in Poznan (Polen, Fundort 81) und anatolischen Wasserfröschen (*Rana* cf. *ridibunda*, Fundort 101, Akcapinar) erzeugt. Die Tiere aus der Population in Poznan wiesen die für einheimische *R. ridibunda* typischen mt- und n-Genotypen auf. Sowohl von den autochthonen *R. ridibunda* als auch von den allochthonen anatolischen *R. cf. ridibunda* wurden kurz vor der natürlichen Reproduktionsperiode je drei Männchen und Weibchen für die Kreuzungen aus den Populationen entnommen (siehe Kreuzungsschema Tab. 4). Die Kreuzungen wurden von Kollegen in der Schweiz nach der von BERGER et al. (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Entnahme der Eier erfolgte 24 h nach der Injektion des Hormons LHRH (Bachem AG, Bubendorf, Schweiz; 12,5 µl Lösung pro Gramm Körpergewicht; Lösung: 2 % LHRH, 0,7 % NaCl), welches die Ovulation induziert.

Tab. 4: Kreuzungsschema.

Nr.	Männchen	Herkunft		Weibchen	Herkunft
1	<i>R. ridibunda</i>	Poznan (PL)	X	<i>R. ridibunda</i>	Poznan (PL)
2	<i>R. cf. ridibunda</i>	Akcapinar (TR)	X	<i>R. ridibunda</i>	Poznan (PL)
3	<i>R. cf. ridibunda</i>	Akcapinar (TR)	X	<i>R. cf. ridibunda</i>	Akcapinar (TR)

Die fertilisierten Eier wurden an das Museum für Naturkunde in Berlin gebracht, wo die weitere Aufzucht und Dokumentation erfolgte. Die geschlüpften Larven jeder Kreuzungsvariante sind auf jeweils drei Behälter mit 4l Wasser (Maße: L30xB18xH15 cm) verteilt worden, wobei sich maximal 20 Tiere in den einzelnen Behälter befanden. In jedem Behälter befand sich eine Hand voll Wasserpflanzen, die als zusätzliche Nahrung der Larven dienten und weiterhin die Wasserqualität verbesserten. Während der Datenerfassungen wurde zweimal wöchentlich das Wasser in den

Behältnissen komplett ausgetauscht. Die Larven erhielten Fischfutter, dessen Menge mit dem Wachstum der Larven gesteigert wurde. Um den Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Entwicklung beurteilen zu können, befanden sich zwei Behältnisse pro Kreuzung im Freien und jeweils eines in einem Raum mit einer annähernd konstanten Temperatur von 25°C. Folgende Parameter wurden während der Aufzucht erfasst: (1) Zahl freischwimmender Larven, (2) Lebendmasse (Gewichte), (3) Entwicklungsstadien und (4) Wassertemperatur.

Die Bestimmung der durchschnittlichen Larvenmassen (Gewichte) erfolgte zweimal wöchentlich bis zum Abschluss der Metamorphose. Dabei wurden jeweils die Larven aus einem Aufzuchtbehälter zusammen gewogen und die Zahl der Tiere festgestellt. Vor dem Wiegen wurden die Larven in einem Sieb gesammelt, kurz aus dem Wasser gehoben und das grob getrocknete Sieb auf eine digitale Waage (Genauigkeit $\pm 0,01$ g) gelegt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei der Boden des Siebs zwischen dem Wiegen in Wasser gehalten wurde, um den Stress für die Larven so gering wie möglich zu halten. Die durchschnittliche Lebendmasse pro Tier ergab sich aus dem Mittelwert der drei Messungen dividiert durch die Zahl der Larven.

Parallel zur Bestimmung der Lebensmassen sind die Entwicklungsstadien jeder Larve einmal wöchentlich festgestellt worden. Die Larven wurden unter einem Binokular betrachtet und mit den Abbildungen und Beschreibungen einer Übersichtstafel in GÜNTHER (1990) verglichen. Auch wenn die Entwicklungsstadien Rangmerkmale darstellen, wurden neben den Modalwerten und der Streuung auch Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt, um die Entwicklungsstadien besser vergleichen zu können.

2.7.2 Statistische Auswertung der Kreuzungsexperimente

Um die Entwicklung der Larvenmassen (Gewichte) vergleichen zu können, wurden diese gegen die Zeit abgetragen und die Bestimmtheitsmaße (R^2) für die Anpassung der Messwerte an verschiedene Funktionen mit Hilfe des Programms „STATGRAPHICS Plus“ ermittelt.

Nach dem die Funktionen mit den höchsten Bestimmtheitsmaßen für die Messwerte (Massenentwicklungen mit der Zeit) ermittelt waren, erfolgte eine lineare Transformation, um die Werte einer linearen Entwicklung anzupassen und dadurch besser miteinander vergleichen zu können. Zu den linearisierten Wertereihen wurden erneut Regressionsgeraden bestimmt und die Messreihen in einfaktoriellen Varianzanalysen (ANOVA) auf signifikante Abweichungen voneinander bezüglich der Anstiege und Schnittpunkte der Y-Achsen untersucht. Diese Berechnungen erfolgten ebenfalls mit Hilfe des Programms „STATGRAPHICS Plus“.

Um signifikante Abweichungen zwischen den Ontogenesestadien der Larven entlang der Zeitachse aus unterschiedlichen Kreuzungsvarianten feststellen zu können, wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Mit Hilfe dieses Tests wird untersucht, ob zwei unabhängige Stichproben derselben Grundgesamtheit entstammen, wenn keine Normalverteilung vorausgesetzt werden kann. Um signifikante Abweichungen zweier Verteilungen erkennen zu können, werden die Mediane der Ränge zweier Wertereihen verglichen. Dazu werden Prüfgrößen ermittelt, die sich

aus dem Vergleich der Rangplätze der Werte zwischen den Stichproben ergeben (Rangplatzunterschreitungen) und mit einer Testgröße (abhängig vom Signifikanzniveau) verglichen. Die U-Tests wurden mit Hilfe eines Internetprogramms durchgeführt (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>).

2.8 Chytridiomykose-Nachweistests

Zum spezifischen Nachweis der DNA von *Batrachochytrium dendrobatidis* wurden mehrere molekulare Tests entwickelt und beschriebene Tests (BOYLE et al. 2004, ANNIS et al. 2004) modifiziert.

Nach umfangreichen Experimenten wurde der von BOYLE et al. (2004) entwickelte Nachweistest auf Basis des ITS1 übernommen und unter modifizierten Bedingungen als Standardtest etabliert (OHST et al. 2006). Mittels dieses PCR-Nachweistests wurden 146 Bp der *B. dendrobatidis*-spezifischen DNA amplifiziert, die einen hochvariablen Teil der ITS1-Region des Pilzes enthielten. Die Primersequenzen und PCR-Bedingungen können den Tabellen 1 und 2 entnommen werden. Durch Sequenzierung von *B. dendrobatidis*-positiven Proben und den Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit veröffentlichten Daten (BOYLE et al. 2004), wurde zusätzlich sichergestellt, dass die amplifizierten Segmente von *B. dendrobatidis* stammten. Die PCR-Produkte von sechs Proben wurden kloniert, um die Qualität der erhaltenen Sequenzen zu verbessern.

Die PCR-Nachweistests bei einheimischen Wasserfröschen erfolgten an Gewebeproben, die zusammen mit den Proben für die genetischen Untersuchungen gesammelt wurden. Über die Proben aus Deutschland hinaus, wurden zu Vergleichszwecken Gewebeproben griechischer Wasserfrösche auf eine mögliche Infektion mit *B. dendrobatidis* getestet. Insgesamt konnte der Test an 331 Proben aus Deutschland sowie an 356 Gewebeproben griechischer Wasserfrösche durchgeführt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Molekulare Daten

3.1.1 Datenumfang

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Zahl der untersuchten Proben, aufgeschlüsselt nach den Hauptursprungsgebieten sowie den an Hand der ITS2-Region und des ND3-Gens bestimmten nukleären und mitochondrialen Genotypen. Insgesamt wurden genetische Merkmale von 907 Proben, die von 189 Fundorten stammten, untersucht. Die ITS2 und ND3-Datensätze konnten nicht komplett von denselben Proben erstellt werden, da die erforderliche DNA-Qualität für eine erfolgreiche Amplifikation der ITS2-Region für einige Proben nicht gegeben war. Eine umfangreiche Probenreihe aus der Türkei stand nur für die Analyse der nukleären DNA zur Verfügung, so dass die mt-Genotypen nicht einbezogen werden konnten. Die Auflistung aller untersuchten Proben und der bestimmten Genotypen kann Anhang 1 entnommen werden.

Tab. 5: Herkunft und Anzahl der untersuchten Proben.

	Probenzahl	ITS2	ND3
Deutschland	447	424	420
Schweiz	35	18	33
Frankreich	135	85	113
Türkei	156	130	25
Griechenland	28	11	26
andere Länder, Vergleichsproben	106	67	70
Summe	907	735	687

3.1.2 Amplifikation und Sequenzierung der molekularen Marker

ITS2-Region

Es war durchgängig notwendig, den PCR-Reaktionen zur Amplifikation der ITS2-Region Betain zuzusetzen, wofür die Q-Solution von Qiagen verwendet wurde. Anderenfalls wurde nur ein stark verkürztes DNA-Fragment gebildet, das neben den flankierenden ribosomalen DNA-Abschnitten (5,8S und 28S) nur ca. 40 Basenpaare (Bp) der ITS2-Region enthielt. Die Ursache dafür wird in stabilen Haarnadelstrukturen (Sekundärstrukturen) vermutet, die während der PCR-Reaktionen an der einzelsträngigen Matrizen-DNA auftreten und das so genannte „*slippage*“ der Polymerase verursachen (VIGUERA et al. 2001). Dabei springt die Polymerase, unter Aussparung der in der Haarnadelstruktur gebundenen Sequenzabschnitte, auf den freien Teil des weiterführenden Einzelstranges über und fährt dort mit der Synthese fort. Auch mit dem Zusatz von Betain sowie einer hohen Annealingtemperatur zur Destabilisierung der Sekundärstrukturen enthielten die PCR-Produkte neben dem Zielfragment noch mehrere verkürzte Fragmente (Abb. 10). Durch Gelextraktion des Zielfragments wurden die verkürzten Fragmente der ITS2-Region vor der Sequenzierung aus den PCR-Produkten entfernt.

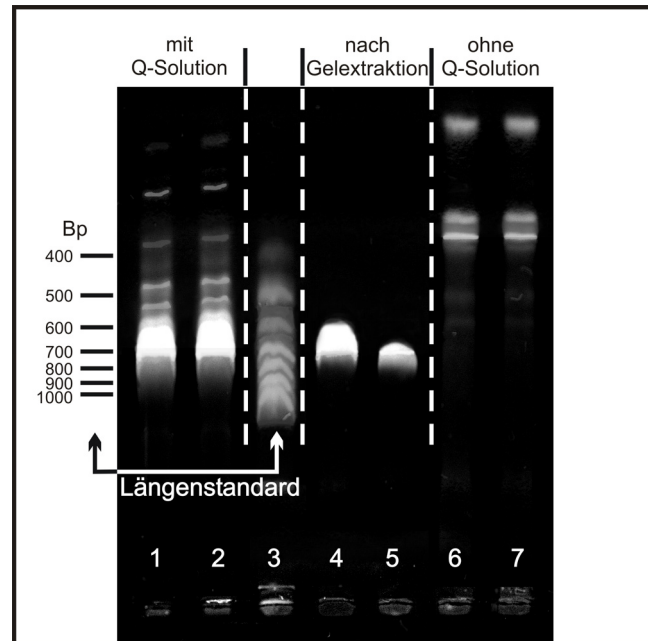


Abb. 10: ITS2 PCR-Produkte, die unter verschiedenen Bedingungen amplifiziert wurden.

Mit einer Ausnahme, brachen die Sequenzierreaktionen bei allen Proben nach ca. 350 Bp ab (nach 250 Bp innerhalb des ITS2). Nur für eine *R. lessonae* (Allel L1) konnte die Gesamtlänge des PCR-Produktes genau bestimmt werden. Diese beträgt 674 Bp, wobei die ITS2-Region 402 Bp umfasst. Der Vergleich mit einer Eintragung in der EMBL-Sequenzdatenbank (AB0099628) zeigte, dass die ITS2-Region von *R. nigromaculata* mit 343 Bp deutlich kürzer ist. Dagegen konnte zwischen dem häufigsten *R. lessonae*- und *R. ridibunda*-Allel im sequenzierbaren Bereich ein Längenpolymorphismus von nur 4 Bp festgestellt werden. Da bei den Wanderungsgeschwindigkeiten der ITS2 PCR-Produkte in Agarosegelen keine Unterschiede erkannt wurden, sind auch außerhalb des sequenzierbaren Bereiches kaum Längenpolymorphismen zu erwarten.

Bei einigen Proben brachen die Sequenzierreaktionen noch früher ab, so dass statt der im Allgemeinen erhaltenen ca. 250 Bp, nur zwischen 100 und 140 Bp sequenziert werden konnten. Dies betraf insgesamt 26 Proben, die von allochthonen *R. cf. ridibunda* aus Deutschland (10), von Zypern (5), aus Anatolien (1) und Armenien (2) stammten. Weiterhin traten kurze Sequenzen bei *R. bedriagae* aus Jordanien (1), *R. cretensis* (2) und *R. shqiperica* (1) auf. Auch bei Genotypen, die im Verbreitungsgebiet von *R. saharica* (Nordafrika) gefunden wurden, brechen die Sequenzierreaktionen verfrüht ab (4). Ein gemeinsamer Ursprung von Merkmalen, die den noch früheren Abbruch der Sequenzierreaktionen bewirken, scheint unwahrscheinlich, da die betroffenen Taxa verschiedenen Verwandtschaftsgruppen angehören und die Sequenzmuster an den Abbruchstellen verschieden sind.

ND3-Gen

Die Länge des amplifizierten Fragments betrug bei allen Proben 431 Bp. Nach dem die flankierenden Sequenzen der t-RNA's entfernt wurden, konnten die kompletten 340 Bp des ND3-Gens in die Sequenzvergleiche einbezogen werden. Nur bei vier selten gefundenen mt-Genotypen konnten zwischen 7 und 55 Bp an den Enden der Fragmente nicht eindeutig bestimmt werden.

3.1.3 Sekundäre Strukturen der ITS2-Region

An Hand der vollständigen ITS2-Sequenzen von *R. lessonae* und *R. nigromaculata* wurden Modelle möglicher Sekundärstrukturen mit Hilfe des Programms mFOLD (ZUCKER et al. 1999) berechnet (Abb. 11 und 12). Es sind lange Haarnadelschleifen erkennbar (Helices), wie sie auch für die ITS2-Region vieler anderer Organismen gefunden wurden. Bei Eukaryoten können vier bis fünf Helices unterschieden werden (SCHULTZE et al. 2005).

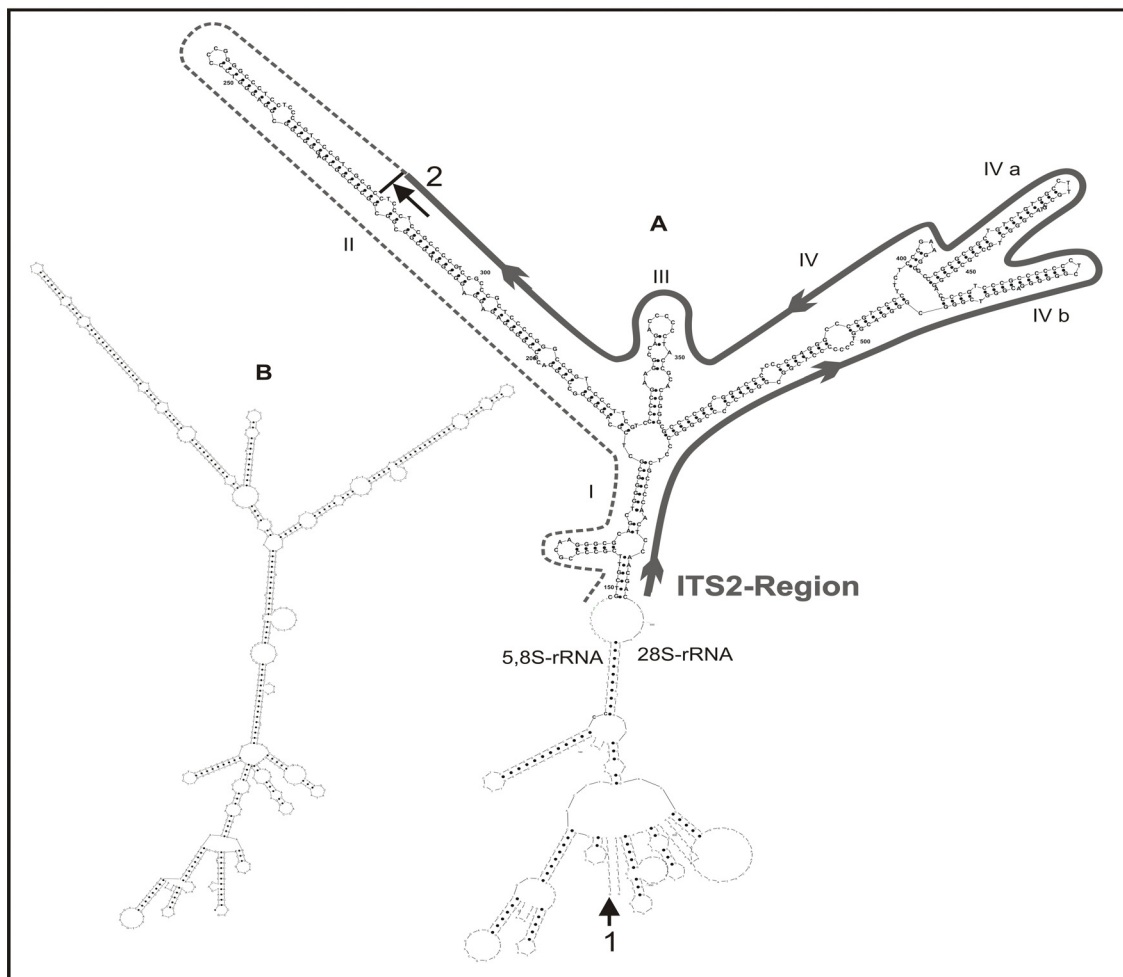


Abb. 11: Sekundärstrukturmodelle der ribosomalen Transkriptionseinheit einer *R. lessonae* (A) und *R. nigromaculata* (B), errechnet mit dem Programm mFOLD (T= 25°C). Der dargestellte Abschnitt umfasst den amplifizierten Bereich. Die Helices sind mit I - IV nummeriert. Die graue Linie kennzeichnet den sequenzierbaren Abschnitt, Pfeile markieren den Anfang der Sequenzen (1) sowie den Bereich, in dem die Sequenzierungsreaktionen abbrechen (2).

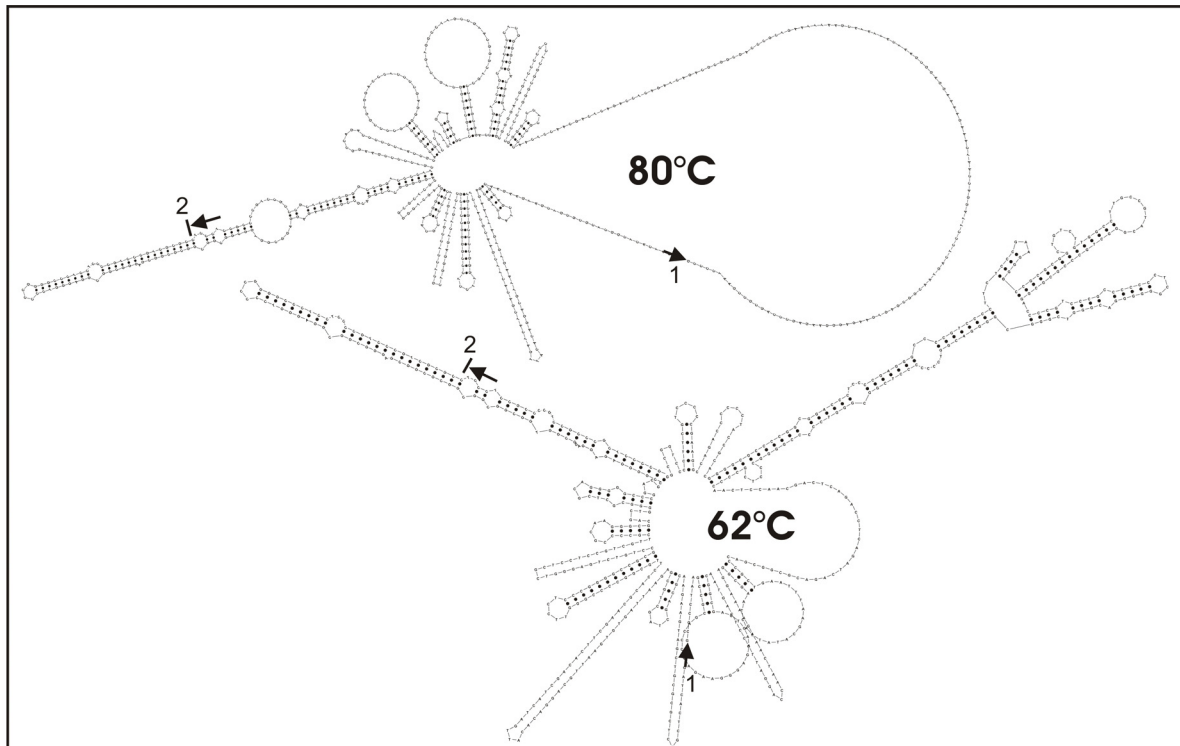


Abb. 12: Faltungsstruktur der ITS2-Region bei verschiedenen Temperaturen, errechnet mit Hilfe des Programms mFOLD für die Sequenz einer *R. lessonae*. Die Pfeile markieren den Anfang der Sequenzen (1) sowie den Bereich, in dem die Sequenzierreaktionen abbrechen (2).

Diese Grundstruktur wurde sowohl bei *R. lessonae* als auch bei *R. nigromaculata* gefunden (Abb. 11), unabhängig davon, ob flankierende Sequenzabschnitte des 5,8S- und 28S-Gens der ITS2-Region angefügt wurden oder nicht.

Die *stem*-Bereiche (gepaarte doppelsträngige Abschnitte) werden durch ausgedehnte GC-Folgen gebildet, wogegen die Basen A und T überwiegend in den ungepaarten *loop*-Bereichen (Schleifen) auftreten. Helix IV in der für *R. lessonae* errechneten Faltungsstruktur kann auf Grund ausgeprägter Haarnadelstrukturen noch weiter unterteilt werden (Abb. 11). Variable Positionen konnten in allen Helices gefunden werden, eine auffallend geringe Variabilität weist jedoch die Sequenz der Helix IVa und der Übergang zur Helix IV auf (Anhang 4).

Der Bereich, in dem die Sequenzierreaktionen vorzeitig terminiert werden, befindet sich innerhalb der Helix II. Die Faltungsstrukturen der ITS2-Region bei verschiedenen Temperaturen, wie sie auch bei einer PCR-Reaktion durchlaufen werden, zeigen, dass die Helix II bereits bei hohen Temperaturen durch lange GC-reiche *stems* ausgebildet wird (Abb. 12). Der *stem* unmittelbar hinter der Abbruchstelle bildet den längsten doppelsträngigen Abschnitt in der errechneten Sekundärstruktur (bei allen Temperaturen). Diese stabile Sekundärstruktur wird als Ursache für die vorzeitigen Terminierungen während der Sequenzierreaktionen angesehen. Auch der Zusatz weiterer Chemikalien (z. B. Formamid, Betain, DMSO) und die Modifikation des Temperaturprofils der Sequenzierreaktionen, um die Sekundärstrukturen zu destabilisieren, verliefen erfolglos.

Wurden die Sequenzen mit dem Gegenprimer erzeugt, brachen die erhaltenen Signale nach ca. 200 Bp ebenfalls am Beginn des längsten *stem*-Bereiches innerhalb der Helix II ab.

3.1.4 Genetische Variabilität und Erstellung der Alignments

Im Gesamtdatensatz sind 11 Arten vertreten, in das ITS2-Alignment konnten auf Grund großer Sequenzunterschiede zwischen einigen Arten jedoch nur sechs aufgenommen werden (siehe Anhänge 4 und 5). *R. cerigensis* und *R. caralitana* wurden auf Grund der geringen genetischen Differenzierungen innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe nicht speziell unterschieden. Bei den Tieren von Rhodos und Karpathos (Griechenland) dürfte es sich um Vertreter von *R. cerigensis* handeln. Einige Proben aus der zentralen Türkei entstammen höchst wahrscheinlich Vertretern von *R. caralitana*.

3.1.4.1 ITS2-Region

Die Bestimmung der ITS2-Allele erfolgte zum einen an homozygoten Tieren, zum anderen wurden PCR-Produkte heterozygoter Tiere kloniert um auch ITS2-Allele bestimmen zu können, die nicht in homozygoter Kombination gefunden wurden. Insgesamt wurden die PCR-Produkte von 28 Proben kloniert und von diesen wiederum 144 Klone untersucht.

Auf dieser Grundlage konnten im Gesamtdatensatz (735 Proben) 56 ITS2-Allele identifiziert werden. Hinweise auf das Vorkommen weiterer Allele ergaben sich aus den Sequenzdaten einiger heterozygoter Tiere, denen keine der bekannten Allele zugeordnet werden konnten. Bei den aus Deutschland stammenden Proben konnten 20 Allele nachgewiesen werden.

Die Genotypen der sechs nordafrikanischen Tiere traten alle im heterozygoten Zustand auf und wurden nicht in die phylogenetischen Untersuchungen einbezogen. Es ist allerdings damit zu rechnen, dass eine Homologisierung der Basenpositionen zwischen den für *R. saharica* typischen und vielen weiteren Genotypen westpaläarktischer Wasserfroschformen kaum möglich ist, wie dies auch der Vergleich mit *R. perezi* nahe legt. Obwohl die Länge der bei *R. perezi* gefundenen ITS2-Allele vergleichbar der von *R. ridibunda* und *R. lessonae* ist, lassen die großen Sequenzdifferenzen keine eindeutige Homologisierung zu. Die *R. perezi*-Genotypen wurden daher nicht in das Alignment aufgenommen. Die Stammbaumrekonstruktionen erfolgten auf der Grundlage von 46 Genotypen aus dem Gesamtalignment mit einer Länge von 268 Bp. Zusätzlich wurde in das Alignment (siehe Anhang 4) ein in Deutschland gefundener, nur verkürzt sequenzierbarer Genotyp einer *R. ridibunda* (RG2) einbezogen sowie ein mittels Klonierung identifizierter Genotyp aus einer süditalienischen Population (Tarsia, Fundort 136) (*rekRL*), der sowohl *R. ridibunda*- als auch *R. lessonae*-spezifische Sequenzmerkmale aufweist. Es wird daher vermutet, dass dieser Genotyp aus einem Rekombinationsereignis hervorgegangen ist.

Das Alignment der ITS2-Region wurde von Hand unter der Maßgabe erstellt, die Zahl der angenommenen evolutionären Schritte zu minimieren. In der ITS2-Region der untersuchten Wasserfrösche treten viele monomere G- bzw. C-Folgen auf. So enthält die erste Sequenz im

Alignment (*RC16*) 15 G- und C-Folgen mit Längen zwischen 4 und 6 gleichen Basen (bis zu 9 bei *RC19*), bei einer Gesamtzahl von 238 Basenpaaren.

Für die Homologisierung der Basenpositionen wurde das Einfügen einer großen Zahl von Gaps nötig. Bei der angenommenen gleichen Wichtung von Basensubstitutionen und Indels traten nur innerhalb kurzer Abschnitte verschiedene Möglichkeiten zur Homologisierung der Basenpositionen auf, so z. B. bei der Frage, ob am 3'- oder 5'-Ende von G- oder C-Folgen Längenpolymorphismen durch das Einfügen von Gaps ausgeglichen werden sollten. Die Alternativen aber führen zu der gleichen Zahl von Transformationsschritten.

Ein hoher Anteil von Gaps findet sich sowohl bei Sequenzvergleichen mit geringen als auch großen genetischen Gesamtdistanzen (Abb. 13). Weiterhin ist zu erkennen, dass Gesamtdistanzen zwischen 5 % und 7,5 % in keinen paarweisen Vergleichen auftraten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der erwähnte Bereich die Grenze zwischen intra- und interspezifischer Diversität bildet. So weisen alle *R. ridibunda*-typischen Allele untereinander eine maximale Divergenz von 4,9 % auf, die der *R. lessonae*- bzw. *R. bergeri*-spezifischen maximal 4,1 % (siehe Anhang 6). Mit 7,5 % tritt die geringste interspezifische Divergenz zwischen *R. epeirotica* (*EPE1*) und *R. ridibunda* (*R11*) auf.

An der Gesamtzahl der Sequenzveränderungen haben Indels im Mittel aller paarweisen Vergleiche einen Anteil von 68,5 %. Wenn beim Vergleich von DNA-Sequenzen Längenpolymorphismen von mehreren hintereinander liegenden Nukleotiden auftreten, besteht grundsätzlich die Frage, ob die Insertion/Deletion mehrerer Nukleotide während eines Mutationsereignisses stattfand oder mit zeitlichem Abstand schrittweise aufeinander folgten.

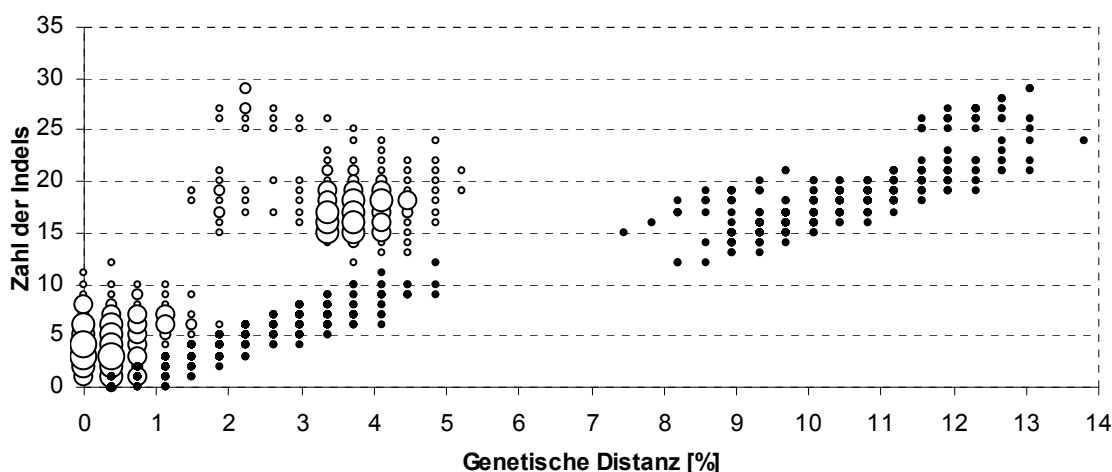


Abb. 13: Anzahl der Indels in Abhängigkeit zur genetischen Distanz zwischen den ITS2-Allelen. Weiße Kreise: Distanzen, die nur aus Basensubstitutionen berechnet wurden; schwarze Kreise: Gesamtdistanz, berechnet aus Basensubstitutionen und Gaps (gleiche Wichtung). Die Größe der weißen Kreise korrespondiert mit der Anzahl gleicher Wertepaare.

Werte: ○51-70 ○21-50 ○11-20 ○6-10 •1-5.

Für die Stammbaumrekonstruktionen wurden aufeinander folgende Positionen mit Gaps als unabhängige Schritte in den Sequenzeveränderungen gewertet. Zwei Beobachtungen stützen die Annahme, dass überwiegend schrittweise Extensionen der Gaps erfolgen: 1) treten Längenpolymorphismen in allen möglichen Zwischenstufen auf (häufig zwischen eng verwandten Taxa) und 2) korreliert die Länge der Indels mit der Zahl der Basensubstitutionen ($r = 0,87$).

3.1.4.2 ND3-Gen

Insgesamt konnten die mt-Genotypen von 687 Proben bestimmt werden, unter denen 65 Genotypen gefunden wurden (Alignment im Anhang 5). In Deutschland konnten 18 mt-Genotypen nachgewiesen werden. Das Alignment der ND3-Sequenzen umfasst 340 Bp, Längenpolymorphismen traten nicht auf.

3.1.5 Homoplasiegehalte der Datensätze

3.1.5.1 ITS2-Datensatz

Die variablen Stellen sind sehr ungleichmäßig über den gesamten ITS2-Abschnitt verteilt, wodurch die Wahrscheinlichkeit für Mehrfach austausche an einzelnen Positionen und damit der Homoplasiegehalt des Datensatzes ansteigt (Abb. 14). Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, weisen die Abschnitte zwischen den Positionen 1 bis 50 sowie 90 bis 167 nur sehr wenige Substitutionen auf. Obwohl diese konservierten Abschnitte 47,7 % der Positionen umfassen, treten dort zusammen nur 14,8 % aller Substitutionen auf. Auf Grund dieser diskontinuierlichen Verteilung muss mit großen Unterschieden hinsichtlich des Homoplasiegehaltes verschiedener Abschnitte bzw. Positionen gerechnet werden.

Das als Homoplasieindex (HI) bezeichnete Verhältnis von Transitionen zu Gesamts substitutionen streut sehr stark bei den paarweisen Vergleichen der ITS2-Allele. Der Mittelwert der Homoplasieindizes aus Vergleichen zwischen Allelen, die sich in mehr als einer Basensubstitution unterscheiden, ist mit 0,64 vergleichsweise niedrig. Für eine genauere Bewertung des Homoplasieindex wurden die Anteile der Transitionen gegen die Gesamtzahl der Basensubstitutionen abgetragen (Abb. 15). Ab einer Gesamtzahl von fünf Substitutionen treten keine Extrema von 0 bzw. 1 mehr auf. Die HI-Werte verlaufen bei ansteigender Zahl der Substitutionen in einem weiten Streubereich (Spannweite 0,45-0,86) um den Mittelwert von 0,60, ohne dass eine Tendenz (Regressionsanalysen) hinsichtlich eines Anstiegs oder Abfalls zu erkennen ist. Zu erwarten wäre ein Absinken des HI-Wertes, da bedingt durch Sättigungseffekte bei höheren genetischen Distanzen, die Anteile der Transitionen sinken sollten. Da maximal 14 Basensubstitutionen zwischen den ITS2-Allelen auftraten, beträgt die allein auf Basensubstitutionen beruhende maximale Sequenzdivergenz nur 5,2 %. Die niedrigen Homoplasieindizes können also zum Teil durch Streuungseffekte erklärt werden.

Darüber hinaus gibt es aber auch große Unterschiede bei den Basenhäufigkeiten. Die GC-Gehalte der im Alignment aufgeführten Sequenzen liegen zwischen 75,5 und 81,1 % (im Mittel 78,0 %).

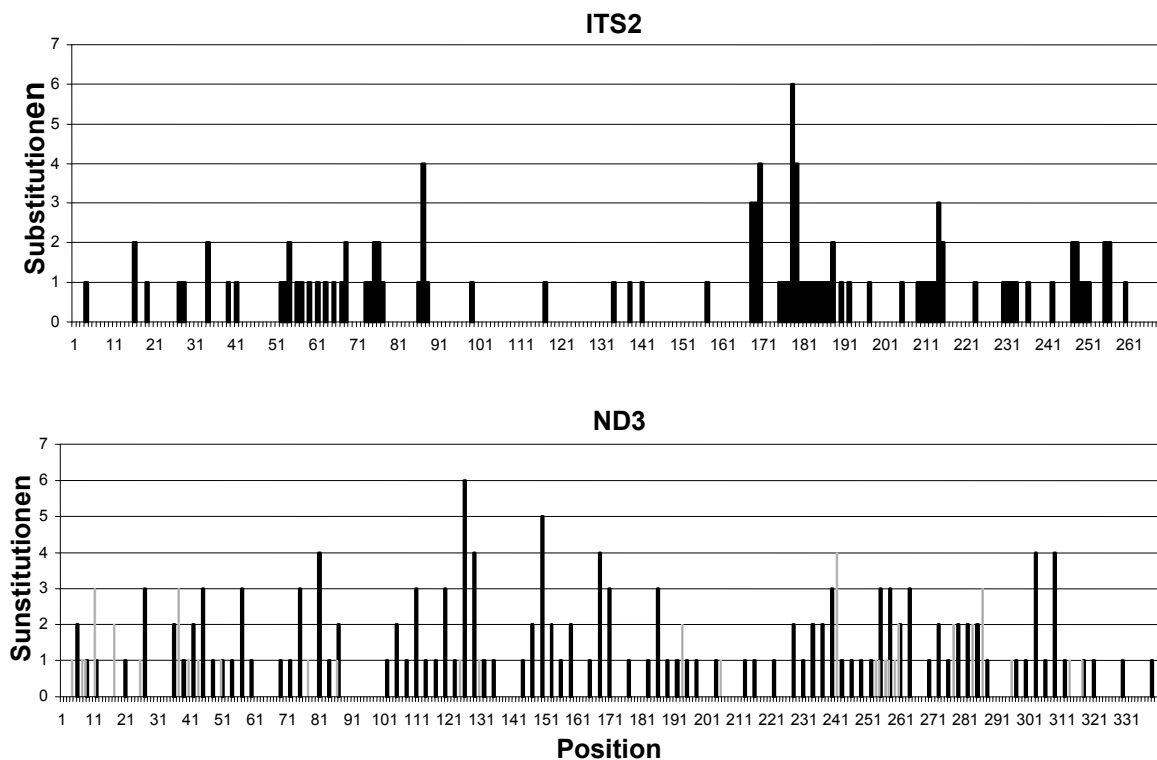


Abb. 14: Variable Positionen in der ITS2-Region und im ND3-Gen. Die Zahl der Substitutionen ergibt sich aus den unabhängigen Transformationsschritten für jede Position, auf Grundlage einer mittels Maximum Parsimonie-Analyse ermittelten Topologie. Gaps wurden als einzelne Substitutionsschritte gewertet. Die schwarzen Balken in der Darstellung für das ND3-Gen kennzeichnen die Variabilität in der dritten, die grauen Balken in der ersten und zweiten Triplettsposition.

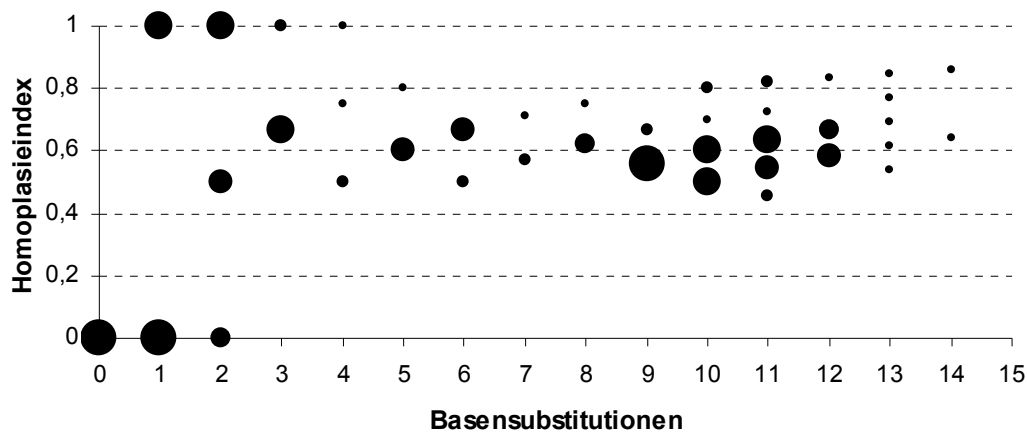


Abb. 15: Beziehung zwischen dem Anteil der Transitionen und der Gesamtzahl der Basensubstitutionen (Homoplasieindex) für paarweise Vergleiche der ITS2-Allele. Die Größe der Datenpunkte korrespondiert mit der Anzahl der Werte.

Werte: ● 101-300 ● 51-100 ● 21-50 ● 11-20 ● 6-10 ● 1-5

Dadurch, dass die Basenhäufigkeiten weit außerhalb des „normalen“ Gleichgewichts fixiert zu sein scheinen, wird die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Transitionen mit den Austauschungen: G→A und C→T herabgesetzt. Die Ursachen für die niedrigen Homoplasieindizes müssen demnach nicht ausschließlich in einem hohen Homoplasiegehalt des Datensatzes zu finden sein, sondern könnten auch durch die Wirkung von Selektionsfaktoren bedingt sein.

Eine MP-Analyse auf Basis des ITS2-Datensatzes ergab für die kürzesten Topologien einen Konsistenz-Index (CI) von 0,72 und einen Retentions-Index (RI) von 0,92. Diese Werte fallen vergleichsweise hoch aus und weisen auf einen geringen Homoplasiegehalt im ITS2-Datensatz hin. Wenn der CI nur für die Parsimonie-informativen Merkmale berechnet wurde (iCI) (Tab. 6), lag dieser noch bei 0,61. Der deutliche Unterschied zwischen CI und iCI wird durch die hohe Zahl von Autapomorphien (37 % aller variablen Positionen) erklärbar, die in die Berechnung des CI jeweils mit dem Wert 1 eingehen.

Durch Sequenzvergleiche zwischen entfernt verwandten Arten lässt sich erkennen, dass die inhomogene Verteilung der variablen Positionen innerhalb der ITS2-Region Sättigungseffekte und damit erhöhte Homoplasiewerte in bestimmten Abschnitten bewirken. Die hohen Substitutionsraten bestimmter Sequenzabschnitte führen dazu, dass zwischen einigen Taxa eine Homologisierung dieser Sequenzabschnitte nicht möglich ist (z. B. *R. perezi*, *R. cretensis* und *R. shqiperica*). Die hier durchgeführten Stammbaumanalysen, deren Ergebnisse vor allem im Hinblick auf die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der eng verwandten *R. ridibunda*- und *R. lessonae*-Gruppe von Interesse sind, sollten dagegen nur geringfügig durch Homoplasien beeinflusst worden sein.

3.1.5.2 Rekombinationen innerhalb der ITS2-Region

Widersprüchliche Merkmalsverteilungen können bei den untersuchten Arten auch durch Rekombinationsereignisse entstehen, da viele Allele syntop auftreten und Kreuzungsbarrieren zwischen den Wasserfroschformen nur schwach ausgeprägt sind. Um Rekombinationen erkennen zu können, wurden die ITS2-Sequenzen in Tabelle 6 nach dem Verwandtschaftsgrad (vgl. Abb. 16) sowie dem sympatrischen bzw. syntopen Vorkommen gruppiert. Da die meisten dieser eng verwandten Allele nur wenige Differenzen aufweisen, gibt es kaum variable Positionen, an Hand derer Rekombinationen erkannt werden können. Erschwerend kommt hinzu, dass an einigen hochvariablen Positionen zwischen den Verwandtschaftsgruppen dieselben konvergenten Polymorphismen zu verzeichnen sind, so z. B. die Positionen 178, 179 und 214. Dennoch lassen sich bei den ITS2-Allelen *RC3* und *RC19* widersprüchliche Merkmalsverteilungen erkennen, die auf Rekombinationen zurückgehen könnten. Diese beiden Allele sind für Deutschland bzw. Frankreich als allochthon anzusehen und stammen wahrscheinlich ursprünglich aus Griechenland. So ließe sich erklären, dass diese Allele in verschiedenen Sequenzabschnitten typische Merkmale griechischer *R. ridibunda* aufweisen, an anderen Positionen solche Merkmale aber fehlen.

[illegible]

Deutliche Hinweise für die Rekombination zwischen einem *R. ridibunda*- und einem *R. lessonae*-spezifischen ITS2-Allel liegen für eine heterozygote *R. kl. hispanica* aus Süditalien vor (*rekRL*). Am Ende dieser Sequenz treten sechs *R. ridibunda*-spezifische Merkmale auf (Tab. 6 schraffiert), wogegen der restliche Abschnitt spezifisch für *R. lessonae* ist.

ND3-Datensatz

Bezogen auf den gesamten ND3-Datensatz sind 144 Positionen variabel, die gleichmäßig über das gesamte Fragment verteilt auftreten (Abb. 14). Innerhalb der Codonpositionen liegt mit 77 % aller Substitutionen die größte Variabilität auf der dritten Position. In Bezug auf die Basenzusammensetzung fällt der niedrige G-Anteil auf (14,4 - 16,8 %). Die Basenhäufigkeiten auf dem kodierenden Strang sind in allen drei Positionen zugunsten von T und C verschoben, besonders niedrig ist der G-Anteil in der dritten Position (5,3 - 13,3 %), die höchsten Anteile erreicht T in der zweiten Position (43,2 - 47,8 %), wodurch die Wahrscheinlichkeiten bestimmter Substitutionen beeinflusst werden.

Der durchschnittliche Homoplasieindex aus allen paarweisen Vergleichen der ND3-Sequenzen betrug $0,85 \pm 0,10$. Die geringsten Werte außerhalb des Streuungsbereiches (p-Distanzen >5 %) treten in paarweisen Vergleichen zwischen *R. perezi* und Vertretern der *R. ridibunda*-Gruppe auf (Minimum 0,64).

Die höchsten genetischen Distanzen werden zwischen *R. perezi* sowie *R. saharica* auf der einen und allen anderen Arten auf der anderen Seite erreicht (durchschnittlich 18,6 %). Daher können für paarweise Vergleiche mit *R. perezi* und *R. saharica* Sättigungseffekte als Ursache für das Absinken der Homoplasieindizes ($\bar{0},74$) angenommen werden, erst recht, wenn der hohe Anteil der Substitutionen in der dritten Codonposition beachtet wird. Bemerkenswert ist, dass auch einige Tiere mit mt-Genotypen, die ursprünglich vermutlich nur in Anatolien vorkamen (*cf. rid-7,-10,-16,-17*), im Vergleich zu anderen Taxa geringe Homoplasieindizes aufweisen ($\bar{0},68$). Bei vielen paarweisen Vergleichen mit den genannten anatolischen mt-Genotypen liegen die genetischen Distanzen bei maximal 5 % und damit weit außerhalb einer möglichen Sättigung, so dass als Ursache für die hohen Anteile von Transversionen auch funktionelle Gründe in Betracht gezogen werden müssen. So führen die Substitutionen bei den genannten Taxa zu mehr Aminosäureaustauschen, als diese bei anderen paarweisen Vergleichen mit ähnlich hohen genetischen Distanzen zu verzeichnen sind (ca. vier mal mehr, wenn alle Vergleiche anatolischer mt-Genotypen betrachtet werden).

Die Konsistenz- und Retentions-Indizes für den Gesamtdatensatz betragen 0,49 bzw. 0,86. Werden Taxa mit basalen Abspaltungen aus dem Datensatz entfernt (*R. saharica*, *R. perezi*), steigt vor allem der CI an. Für einen Stammbaum, der ausschließlich die mt-Genotypen der *R. ridibunda*-Gruppe enthält, betrugen die Werte für CI 0,83 und für RI 0,90 (Abb. 19), was auf nur geringe Homoplasiegehalte bei den besonders relevanten Sequenzvergleichen hindeutet.

3.2 Differenzierung von Wasserfröschen an Hand der molekularen Datensätze

Geordnet nach den grundlegenden Kriterien: 1) phylogenetische Beziehungen, 2) Verbreitungsmuster, 3) Häufigkeit sowie 4) Populationsgenetik werden im Folgenden die Ergebnisse dargelegt, die zur Differenzierung allochthoner von autochthonen Wasserfröschen auf Grundlage ihrer Genommerkmale genutzt werden können.

3.2.1 Phylogenetische Analysen

Sowohl für den ITS2- als auch den ND3-Datensatz kamen die Maximum Likelihood (ML)- und Maximum Parsimonie (MP)-Stammbaumrekonstruktionsverfahren zur Anwendung. Alle Stammbäume sind ungewurzelt, stellen also Topologien der Verwandtschaftsverhältnisse dar, ohne dass die Lesrichtung der Merkmale bestimmt wurde. Bei molekular systematischen Analysen ist die Verwendung mehrerer Außengruppen angebracht, um die Überdeckung pleisiomorpher Merkmalszustände durch Autapomorphien, in den als Außengruppenvertreter verwendeten Linien ausgleichen zu können (KNOOP & MÜLLER 2006). In der vorliegenden Untersuchung wurde auf Wurzelungen verzichtet, da zum einen Sequenzen möglicher Außengruppenvertreter nicht in das ITS2-Alignment einbezogen werden konnten und zum anderen die Verwandtschaftsverhältnisse aller untersuchten Taxa auf Grundlage der mt-Genotypen dargestellt werden sollten.

3.2.1.1 ITS2-Region

Hypothesen zu den verwandtschaftlichen Beziehungen aller analysierten ITS2-Allele sind in Abb. 16 und 17 dargestellt. Es können drei monophyletische Gruppen abgegrenzt werden: 1) die *R. ridibunda*-Gruppe, 2) die *R. lessonae*-Gruppe und 3) *R. epeirotica*. Die durchschnittlichen p-Distanzen zwischen diesen drei Gruppen liegen zwischen 10,25 und 10,45 %. Auf Grund dieser geringen paarweisen Unterschiede kann keine engere Verwandtschaft zwischen zwei der Gruppen gegenüber einer anderen erkannt werden. Auch an Hand der Astlängen in den ML- und MP-Stammbäumen (Abb. 16 und 17) lassen sich ähnlich stark ausgeprägte Differenzierungen zwischen der *R. ridibunda*-Gruppe, der *R. lessonae*-Gruppe und *R. epeirotica* erkennen. (Zu beachten ist, dass es sich bei den Stammbäumen um ungewurzelte Topologien handelt, die außer den betrachteten Taxa keine weiteren enthalten.)

Im Vergleich zu den drei monophyletischen Gruppen, sind die genetischen Differenzen zwischen den 12 Allelen innerhalb der *R. lessonae*-Gruppe und den 33 Allelen der *R. ridibunda*-Gruppe deutlich geringer (0,37-4,85%). Die mit „R“ bzw. „RC“ bezeichneten *R. ridibunda*-spezifischen Genotypen bilden in dem MP-Stammbaum monophyletische Einheiten (Abb. 17). Da sowohl Allele der *R*- als auch der *RC*-Gruppe in anatolischen Populationen syntop vorkommen, könnten auch Rekombinationen für die geringe Unterstützung der monophyletischen Einheit der jeweiligen Gruppen verantwortlich sein.

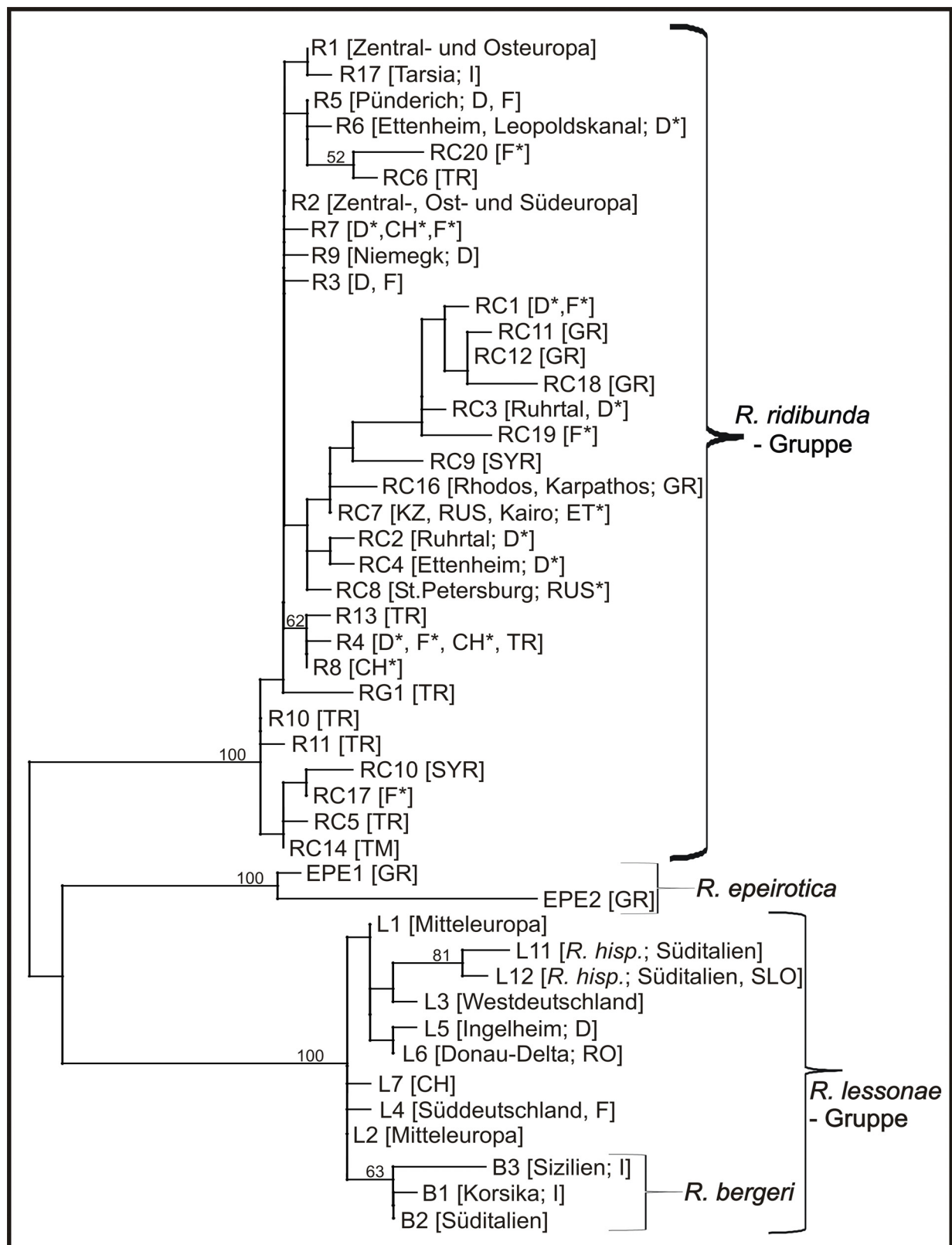


Abb. 16: Stammbaum der ITS2-Allele, erstellt mit dem Maximum Likelihood-Verfahren (JC-Sequenzevolutionsmodell, Likelihood -1123,9). Alle Bootstrap-Werte über 50 % sind an den entsprechenden Verzweigungen eingetragen. Die Länderkürzel sind im Abkürzungsverzeichnis (S. 95) aufgeführt. * Vorkommen werden als allochthon angesehen. *R. hisp.* - *R. kl. hispanica*.

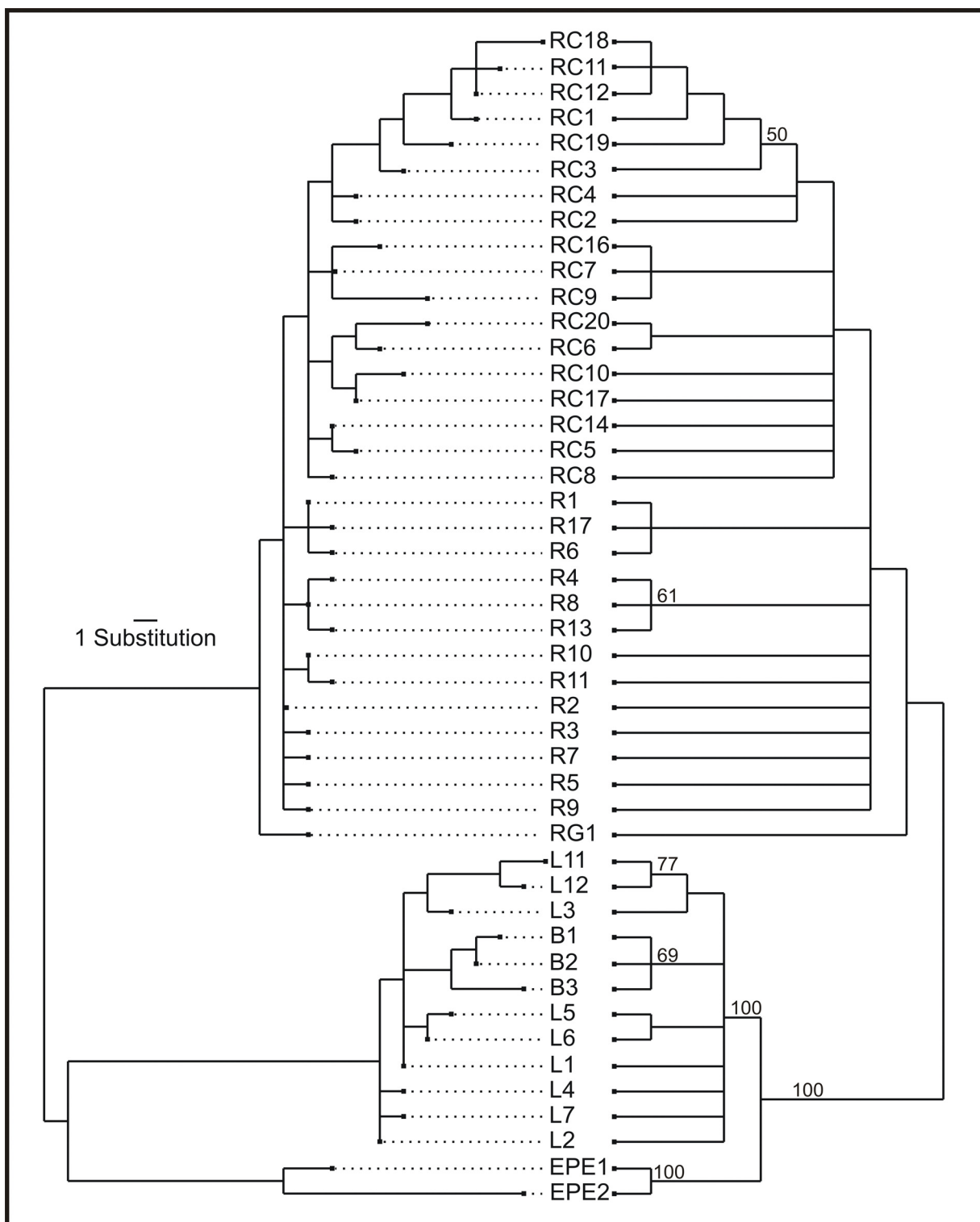


Abb. 17: Stammbäume der ITS2-Allele erstellt mit dem Maximum Parsimonie-Verfahren, gewichtet nach dem Goloboff „total fit“ Kriterium (k2). Links ist ein Baum von 4350 gleichwertigen Bäumen dargestellt (Score -42,41; CI=0,715; RI=0,916), rechts ist der *Strict Consensus*-Baum abgebildet. Gaps wurden als fünfte Base definiert. Bootstrap-Werte über 50 % sind vor den entsprechenden Verzweigungen angegeben.

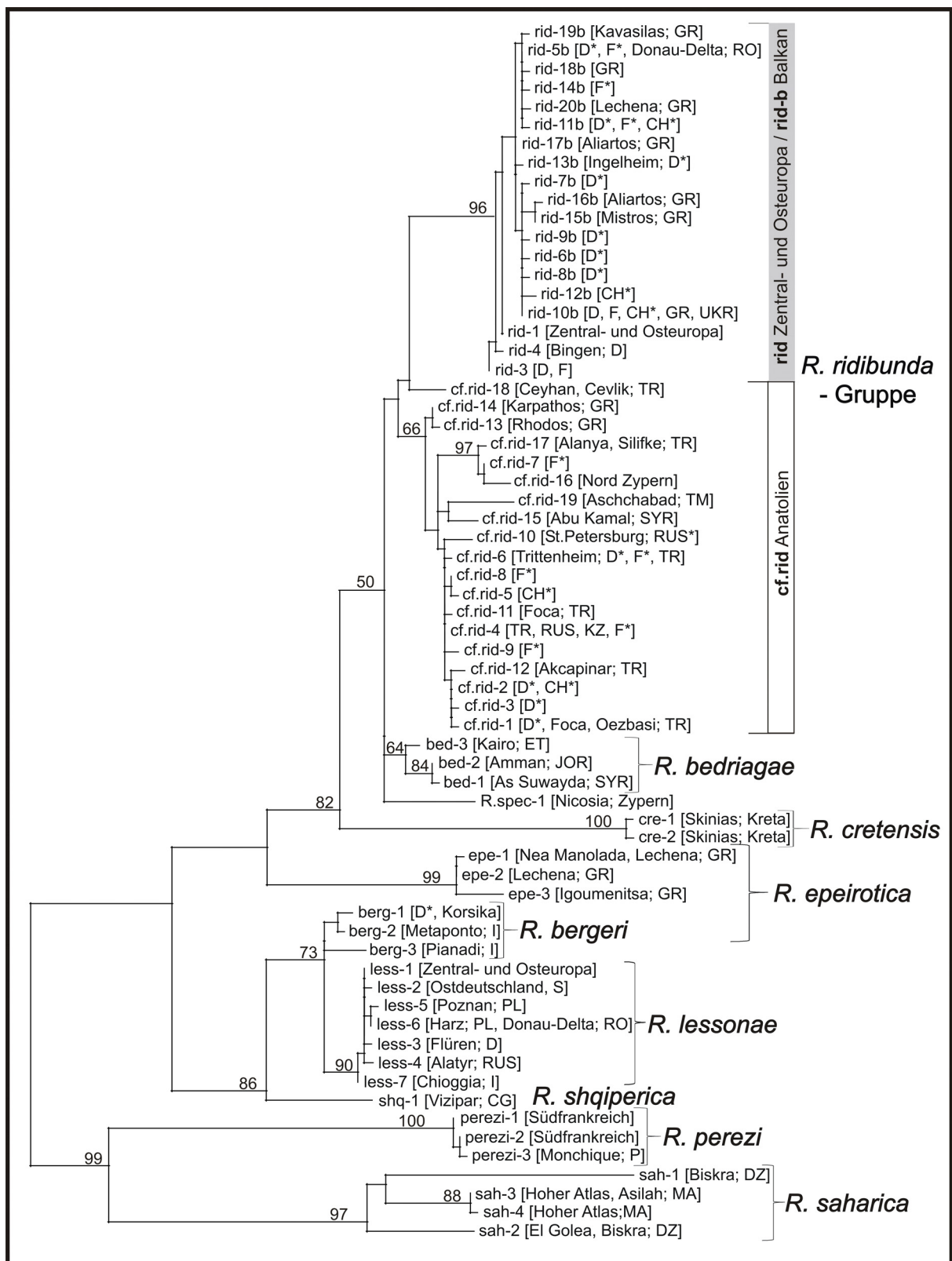


Abb. 18: ML-Stammbaum, berechnet auf Grundlage aller mt-Genotypen (ND3-Sequenzen) (GTR+G-Sequenzevolutionsmodell). Alle Bootstrap-Werte über 50 % sind an den entsprechenden Verzweigungen eingetragen. Die Länderkürzel sind im Abkürzungsverzeichnis (S. 95) aufgeführt. * Vorkommen werden als allochthon angesehen.

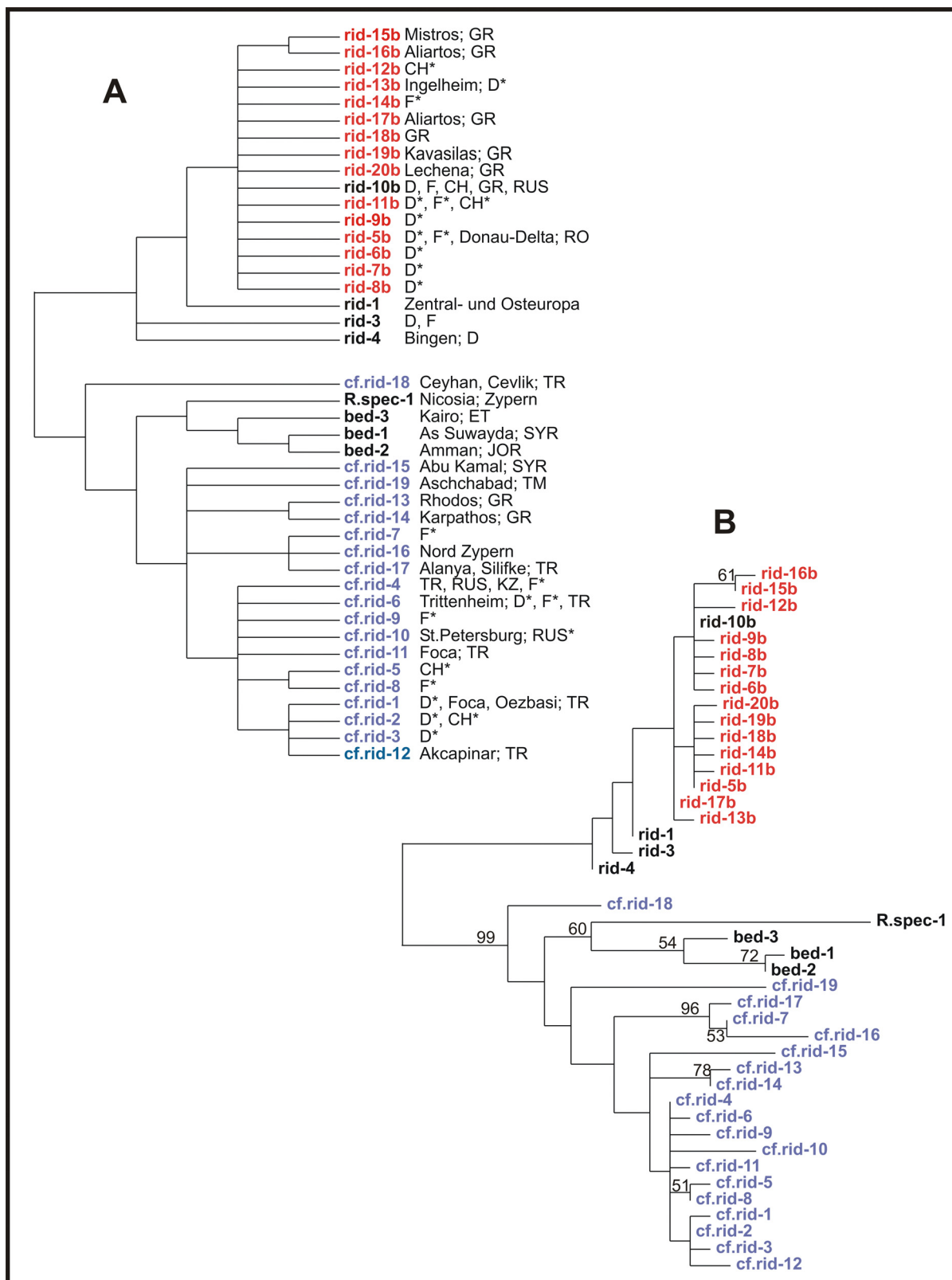


Abb. 19: Stammbäume auf Grundlage der mt-Genotypen (ND3-Sequenzen) der *R. ridibunda*-Gruppe, A: *Strict Consensus* MP-Baum (aus 28 Bäumen, CI=0,832 RI=0,897), B: ML-Baum (GTR+G-Model). Bootstrap-Werte über 50 % sind vor den entsprechenden Verzweigungen angegeben. Farben: schwarz - autochthon, rot - Vorkommen / Ursprung auf dem südlichen Balkan, blau - Vorkommen / Ursprung in Anatolien.

Eine Abgrenzung der für *R. bedriagae* typischen ITS2-Allele innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe konnte nicht erkannt werden. Vermutlich repräsentieren die Allele *RC9* und/oder *RC10* ITS2-Allele von *R. bedriagae*. Die auch auf Basis des ND3-Gens gefundenen, vergleichsweise geringen genetischen Unterschiede (3,5-6,8%), deuten auf wenig ausgeprägte Differenzierungen zwischen *R. bedriagae* und *R. ridibunda* hin (Abb. 18 und 19). Innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe können die aus Griechenland stammenden Allele *RC11*, *-12* und *-18* klar abgegrenzt werden (Abb. 16 und 17). Zusammen mit diesen drei, bilden die Allele *RC1*, *-3* und *-19*, die in Deutschland und Frankreich nachgewiesen wurden, ein Monophylum. Die Vorkommen der Allele *RC1*, *-3* und *-19* gehen in Deutschland und Frankreich daher vermutlich auf Einschleppungen zurück.

Auch die Allele *RC2* und *RC4* zeigen eine enge Verwandtschaft zu südeuropäischen und anatolischen Formen, die Vorkommen dieser Allele im Ruhrtal und in Ettenheim (Deutschland) werden deshalb als allochthon angesehen. Das in Frankreich nachgewiesene Allel *RC20* dürfte ebenfalls allochthonen Ursprungs sein, da es eine enge Verwandtschaft zu dem in Anatolien gefunden Allel *RC6* aufweist. Eine weitere monophyletische Gruppe, die sowohl im Strict Consensus Stammbaum (MP) als auch im Ergebnis der ML-Analyse erkennbar wurde, bilden die Allele *R4*, *R8* und *R13*. Die geringen genetischen Distanzen zwischen dem in Süddeutschland auftretenden Allel *R4* und den anatolischen Allelen *R8* und *R13* legen die Vermutung nahe, dass *R4* in Deutschland eingeschleppt wurde.

Eine klare Abgrenzung aller in Anatolien nachgewiesenen Allele von den in Zentraleuropa autochthon verbreiteten *R. ridibunda*-Allelen (*R1*, *R2* und *R3*), ist auf Grund der geringen genetischen Differenzen nicht möglich. So ist der Ursprung der in Deutschland verbreiteten Allele *R5*, *R6*, *R7* und *R9* allein an Hand der phylogenetischen Analysen nicht eindeutig zu klären.

Die Allele der *R. lessonae*-Gruppe umfassen ebenfalls die für *R. bergeri* typischen Varianten, da auch Allele von Tieren aus bekannten Verbreitungsgebieten dieser Art untersucht wurden (Korsika, Sizilien, Süditalien). Die Abgrenzung der für *R. bergeri* typischen Allele (*B1*, *B2*, *B3*) von *R. lessonae* basiert auf einer nur geringen Anzahl von Merkmalen (zwei Synapomorphien gegenüber den anderen *R. lessonae*-Allelen). Möglicherweise können auch die Allele *L11* und *L12* zu den *R. bergeri*-typischen Allelen gezählt werden. Trotz klarer genetischer Differenzen zwischen den Allelen *B1*, *B2* und *B3* auf der einen sowie *L11* und *L12* auf der anderen Seite (1,5 - 4,1 %), kommen auf Grund der geographischen Verbreitung beide Schwestergruppen als Allelvarianten von *R. bergeri* in Frage. Auch die mt-Genotypen von *R. bergeri* zeigen, verglichen mit den *R. lessonae* mt-Genotypen, eine hohe Variabilität (Abb. 18).

Die nächst verwandten Varianten zu dem in Süddeutschland gefundenen ITS2-Allel *L3* sind die Allele *L11* und *L12*, die bei süditalienischen und slowenischen Wasserfröschen nachgewiesen wurden. Das Allel *L3* wurde mit einer Ausnahme nur in süddeutschen Populationen gefunden, in denen ein hoher Anteil von *R. bergeri*-spezifischen mt-Genotypen vorkommt. Das syntope Auftreten der *R. bergeri* mt-Genotypen mit dem ITS2-Allel *L3* spricht für einen gemeinsamen Ursprung der beiden genetischen Merkmale.

Auch wenn eine Abgrenzung der Arten *R. saharica*, *R. perezi*, *R. shqiperica* und *R. cretensis* auf Grundlage der ITS2 möglich ist, können die verwandtschaftlichen Beziehungen dieser Arten auf Grund der hohen Variabilität dieses Markers nicht vergleichend zu den Ergebnissen des ND3-Gens analysiert werden.

Die Bootstrap-Werte der meisten Aufspaltungen innerhalb der Topologie für die ITS2-Allele liegen unter 50 %, da diese auch nur durch wenige Synapomorphien gestützt werden. Die Gruppierungen innerhalb des *R. ridibunda*- und *R. lessonae*-Clades werden mit nur durchschnittlich 1,1 bzw. 1,5 gemeinsamen Sequenzpositionen unterstützt (Abb. 17). Zusammen mit der geringen Zahl stützender Merkmale, führen Inkongruenzen zu geringen Wiederfindungswerten in den Bootstrapreplikationen.

3.2.1.2 ND3-Gen

Um im Rahmen der Maximum Likelihood-Analysen ein dem Datensatz entsprechendes Sequenzevolutionsmodell zu ermitteln, kam das Programm „MODELTEST“ zur Anwendung. Den maximalen Likelihood-Wert erhielt das *General Time Reversible Model* (GTR) mit der zusätzlichen Annahme eines Anteils invariabler Positionen (I) und verschiedener Substitutionsraten entlang der Alignmentpositionen (Ratenheterogenität, G). Bei der Anwendung dieses Modells wurden die Parameter der Sequenzevolution aus den Daten geschätzt (Basenhäufigkeit, Austauschraten unter den verschiedenen Substitutionstypen, Anteil invariabler Positionen und Ratenheterogenität). Die Stammbaumberechnungen erfolgten zunächst auf der Grundlage des Gesamtdatensatzes (Abb. 18). In weiteren Analysen wurden ausschließlich mt-Genotypen der *R. ridibunda*-Gruppe einbezogen, weil diese von besonderem Interesse sind (Abb. 19). Wie aus Abbildung 19 hervorgeht, sind die Ergebnisse der Stammbaumrekonstruktionen auf der Basis von Maximum Parsimonie und Maximum Likelihood weitgehend identisch. Unterschiede bestehen nur hinsichtlich der etwas geringeren Auflösung des *Strict Consensus* MP-Baums. Die Stammbaumhypothese des Gesamtdatensatzes entspricht den Ergebnissen früherer Untersuchungen zur Phylogenie des westpaläarktischen Wasserfroschkomplexes (vergleiche Abb. 2 und 18).

Auf Grundlage des mtDNA-Stammbaums steht *R. epeirotica* im Schwestergruppenverhältnis zur *R. ridibunda*-Gruppe einschließlich *R. cretensis*, was allerdings nur durch einen geringen Bootstrap-Wert (< 50 %) unterstützt wird.

In der *R. ridibunda*-Gruppe wurden 42 mt-Genotypen zusammengefasst, die auch *R. bedriagae* sowie eine Form von Zypern enthält, deren systematischer Status bisher unklar ist (Abb. 19). Innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe sind zwei *Clades* abgrenzbar. Das erste *Clade* umfasst die auf dem Balkan und in Zentraleuropa vorkommenden *R. ridibunda* (*rid-b* bzw. *rid*). Im zweiten *Clade* sind die aus Anatolien und dem Kaukasusgebiet stammenden Individuen (*cf. rid*) sowie *R. bedriagae* (*bed*) zusammengefasst. Auffallend ist die deutliche Separierung des im Südosten der Türkei verbreiteten mt-Genotyps *cf. rid-18* innerhalb dieser Gruppe. Die von einem Tier dieses mt-Genotyps bestimmte ITS2-Sequenz zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede zu weiteren

anatolischen Linien. Die klare Abgrenzung der anatolischen mt-Linien erleichtert die Einstufung der einheimischen Tiere als autochthon bzw. allochthon.

Vier in Deutschland gefundene mt-Genotypen (*cf.rid-1*, -2, -3, -6) werden auf Grund der engen verwandtschaftlichen Beziehungen zu anatolischen Formen als allochthon angesehen. Weitere anatolische Linien konnten in Frankreich (*cf.rid-6*, -7, -8, -9) sowie der Schweiz (*cf.rid-2*, -5) nachgewiesen werden. Die in Deutschland auftretenden anatolischen mt-Genotypen sind untereinander enger verwandt als die in Frankreich vorkommenden. Wahrscheinlich stammen daher die in Deutschland gefundenen Tiere anatolischen Ursprungs aus einem geographisch relativ kleinen Gebiet.

Die genetischen Differenzen zwischen den balkanischen (*rid-b*) und den nördlich davon verbreiteten *R. ridibunda* (*rid*) sind mit durchschnittlich 1,5 % gering, zwei Synapomorphien erlauben aber dennoch die Unterscheidung zwischen einheimischen und balkanischen *R. ridibunda*. Eine Ausnahme bildet der mt-Genotyp *rid-10b*. Dieser Genotyp wurde in vielen deutschen Populationen sowie in Osteuropa und Frankreich gefunden. Ein allochthoner Ursprung ist daher sehr unwahrscheinlich.

Als allochthon anzusehen sind dagegen die in Deutschland verbreiteten mt-Genotypen *rid-5b* bis -9b sowie *rid-11b* und -13b. In Frankreich konnten drei (*rid-5b*, -11b, -14b) und in der Schweiz zwei *R. ridibunda* mt-Genotypen balkanischen Ursprungs nachgewiesen werden (*rid-11b*, -12b).

Der für *R. bergeri* typische mt-Genotyp *berg-1* tritt innerhalb Deutschlands in eng begrenzten Gebieten auf. Außerhalb Deutschlands konnte dieser Genotyp nur auf Korsika, in Süditalien und der Schweiz (nicht im Datensatz) nachgewiesen werden. Neben *berg-1* gibt es noch weitere für *R. bergeri* typische mt-Genotypen (*berg-2*, -3) (Abb. 18). Ein Punkt, der für einen autochthonen Ursprung des genetischen Materials von *R. bergeri* in Deutschland spricht, ist die Einheitlichkeit der mt-Genotypen. Die Verteilung der genetischen Vielfalt von *R. bergeri* zeigt dabei Parallelen zu *R. ridibunda*. Auch *R. ridibunda* weist eine hohe genetische Diversität in den südlichen Verbreitungsgebieten auf und nur wenige mt-Genotypen in Mitteleuropa, mit Ausnahme der Populationen, die von allochthonen Individuen beeinflusst wurden.

3.2.2 Geographische Verteilung der ITS2-Allele und mt-Genotypen

3.2.2.1 Verbreitung der ITS2-Allele in der Westpaläarktis

Abbildung 20 zeigt die geographischen Verteilungen der beiden jeweils häufigsten ITS2-Allele von *R. ridibunda* (*R1* und *R2*) bzw. *R. lessonae* (*L1* und *L2*) in der westlichen Paläarktis. Die *R. ridibunda*-spezifischen Allele *R1* und *R2* haben ein großes Verbreitungsgebiet, das sich von Südfrankreich über Zentral- und Osteuropa (Deutschland, Polen) bis nach Russland erstreckt. Das Allel *R2* wurde darüber hinaus auch in Südosteuropa und Anatolien gefunden. Nördlich des Balkans fehlen Nachweise der beiden *R. ridibunda*-Allele, aus dieser Region wurden aber auch nur wenige Proben untersucht. Vorkommen des Allels *R2* finden sich an der Westküste des Schwarzen Meeres und im europäischen Teil der Türkei.

Ebenso ausgedehnt sind die Verbreitungsgebiete der beiden *R. lessonae*-spezifischen Allele *L1* und *L2*, die vermutlich im gesamten Areal dieser Art vorkommen. Da in Frankreich und der Schweiz (bis auf eine Ausnahme) keine *R. lessonae* beprobt wurden, fehlen entsprechende Nachweise von dort.

Die hybride *R. kl. esculenta* weist die jeweils gleichen *R. lessonae* und *R. ridibunda* ITS2-Allele auf, die auch bei den sympatrisch auftretenden Elternarten vorkommen.

Auf dem anatolischen Festland konnten insgesamt sieben ITS2-Allele nachgewiesen werden, von denen nur eines auch in anderen Regionen gefunden wurde (*R2*).

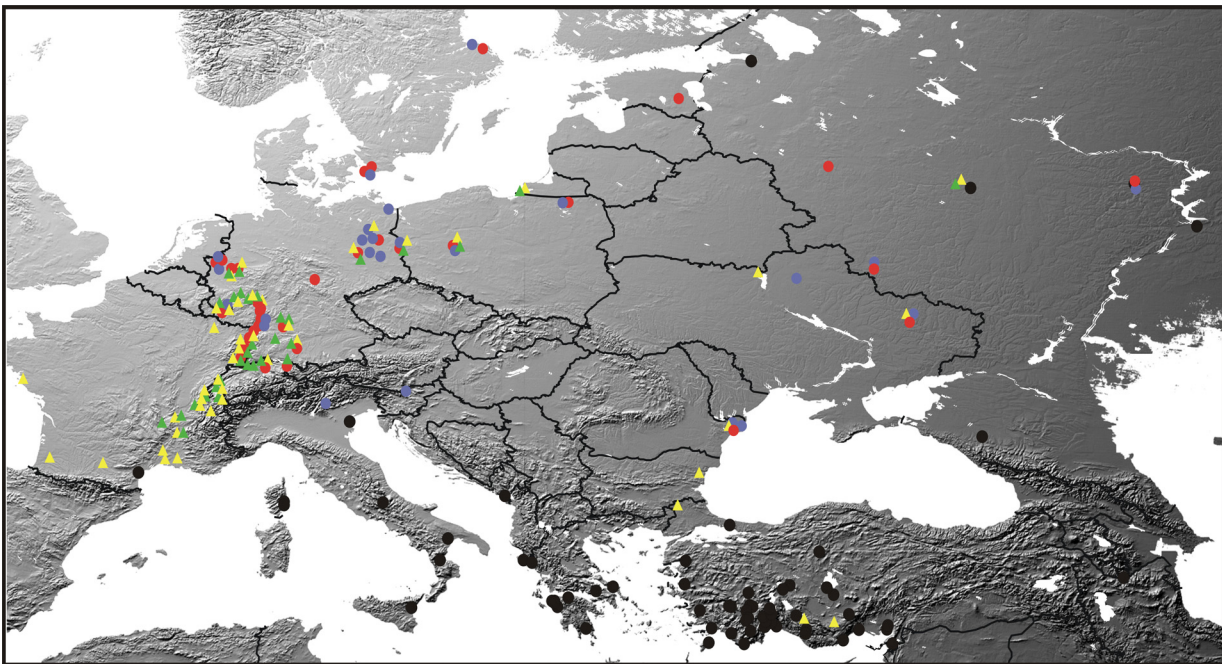


Abb. 20: Nachweise der beiden häufigsten *R. ridibunda*- bzw. *R. lessonae*-Allele. Kreise: Vorkommen von *R. lessonae*-Allelen; blau-*L1*, rot-*L2*. Dreiecke: Vorkommen von *R. ridibunda*-Allelen; grün-*R1*, gelb-*R2*. Fundorte ohne Nachweise eines der vier Allele sind schwarz markiert.

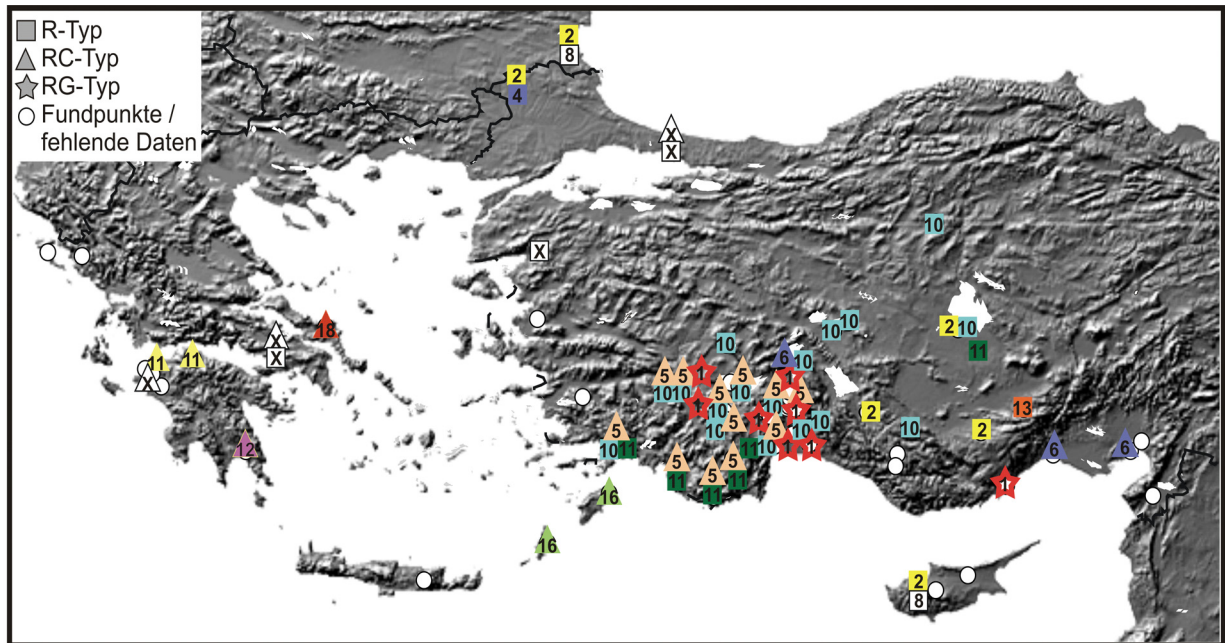


Abb. 21: Nachgewiesene ITS2-Allele in Anatolien und Griechenland. Die Nummern ergeben zusammen mit den Symbolen die Bezeichnung des Allels. Die weißen Dreiecke und Quadrate stehen für Allele des RC- bzw. R-Typs, die nicht genauer bestimmt werden konnten.

Die anatolischen Proben stammen schwerpunktmäßig aus dem Lake Distrikt im Südwesten der Türkei (Abb. 21). Grenzen in der Verbreitung einzelner Allele innerhalb Anatoliens können deshalb nur eingeschränkt bestimmt werden. So scheint das Allel *RC5* im gesamten Gebiet des Lake Distrikts bis an die Südküste verbreitet zu sein. Die Allele *R10* und *R11* konnten im selben Gebiet, aber auch darüber hinaus noch deutlich weiter nordöstlich nachgewiesen werden. Das bei drei Tieren von den Inseln Rhodos und Karpathos homozygot auftretende Allel *RC16* konnte nicht auf dem Festland nachgewiesen werden und könnte daher spezifisch für *R. cerigensis* sein. Auf Zypern konnte das weit verbreitete Allel *R2* sowie das auch in Bulgarien und der Schweiz nachgewiesene Allel *R8* gefunden werden. Für das Vorkommen weiterer Allele gibt es Hinweise aus den ITS2-Sequenzen, eine genaue Bestimmung gelang aber nicht.

Während in Anatolien *R. ridibunda*-Allele der Typen *R* und *RC* verbreitet sind (Verhältnis ca. 3:1), konnte in Griechenland, bis auf eine Ausnahme, nur der *RC*-Typ nachgewiesen werden. Eine geographische Trennung der Typen *R* und *RC* innerhalb Anatoliens ist nicht sichtbar.

Die in Griechenland vorkommenden Allele (*RC11*, -12 und -18) traten in autochthonen Populationen nördlich des Balkan bzw. der Kaukasusregion nicht auf.

3.2.2.2 Verbreitung der ITS2-Allele und mt-Genotypen in Deutschland

Die Verbreitungen allochthoner ITS2-Allele und allochthoner mt-Genotypen der *R. ridibunda*-Gruppe in Westdeutschland (sowie den südwestlich angrenzenden Regionen) wurden in den Abb. 22 und 23 dargestellt und werden im Folgenden zusammenhängend betrachtet.

Die überwiegende Zahl der in Deutschland gesammelten Proben (86,6 %) wurde aus Populationen entlang des Rheins, der Mosel und der Ruhr entnommen. Unter diesen Proben konnten 13 ITS2-Allele und 14 mt-Genotypen der *R. ridibunda*-Gruppe nachgewiesen werden. Unter den *R. ridibunda*-spezifischen mt-Genotypen werden *rid-1*, -3 und -4 als autochthon angesehen. Neben diesen drei, kann nach dem gefundenen Verbreitungsmuster auch der mt-Genotyp *rid-10b* als autochthon gelten. Dieser mt-Genotyp wurde sowohl in vielen Populationen Mittel- und Osteuropas als auch in Griechenland gefunden.

Neben den autochthonen *R. ridibunda*-spezifischen ITS2-Allelen *R1* und *R2* tritt in Deutschland das *R3*-Allel vergleichsweise häufig auf. Die Verbreitung dieses Allels beschränkt sich in Deutschland aber auf das Gebiet um und nördlich von Karlsruhe. Das Allel *R3* konnte entlang des Rheins mit abnehmender Häufigkeit bis zur Einmündung der Mosel sowie an der Kocher nachgewiesen werden. Außerhalb Deutschlands wurde das Allel nur in Südfrankreich gefunden.

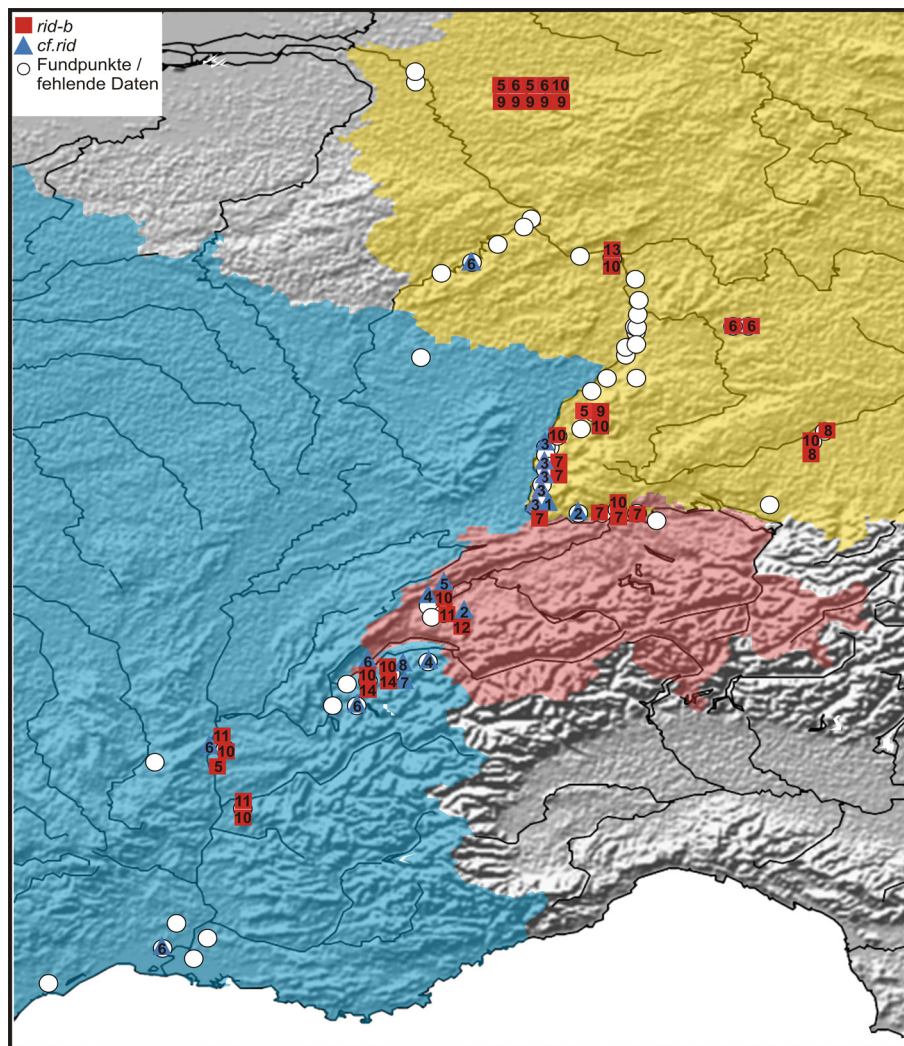


Abb. 22: Fundorte von mt-Genotypen der *R. ridibunda*-Gruppe in Süddeutschland, der Schweiz und Südfrankreich. Die mt-Genotypen *rid-1*, -3, -4 wurden nicht dargestellt. Die Nummern ergeben zusammen mit den Symbolen die Bezeichnung des mt-Genotyps.

Das Verbreitungsgebiet des Allels *R3* deckt sich weitgehend mit dem des mt-Genotyps *berg-1*. Da auch dieser für *R. bergeri* typische mt-Genotyp ausschließlich im Gebiet um Karlsruhe auftritt, dort aber sehr häufig vorkommt, sind die Informationen zur Bewertung seines Ursprungs ähnlich widersprüchlich wie beim ITS2-Allel *R3*.

Im Ruhrtal wurden neben den als autochthon angesehenen ITS2-Allelen (*R1*, *R2*) und mt-Genotypen (*rid-1*, *rid-10b*) bei Wasserfröschen viele genetische Merkmale festgestellt, die auf Aussetzungen balkanischer *R. ridibunda* zurückgehen. Die mt-Genotypen *rid-5b* und *-9b* konnten mit einer Ausnahme (Fischzuchtanlage Ettenheim) nur im Ruhrtal nachgewiesen werden. Auch die ITS2-Allele *RC2* und *RC3* konnten nur im Ruhrtal gefunden werden, was dafür spricht, dass dort erst in jüngster Vergangenheit balkanische Wasserfrösche ausgesetzt wurden. Die untersuchten Proben lieferten keine Hinweise darauf, dass auch Tiere aus Anatolien dort eingeschleppt wurden. Dagegen lassen in Süddeutschland die Untersuchungen der mitochondrialen DNA Einflüsse balkanischer und anatolischer Wasserfrösche erkennen.

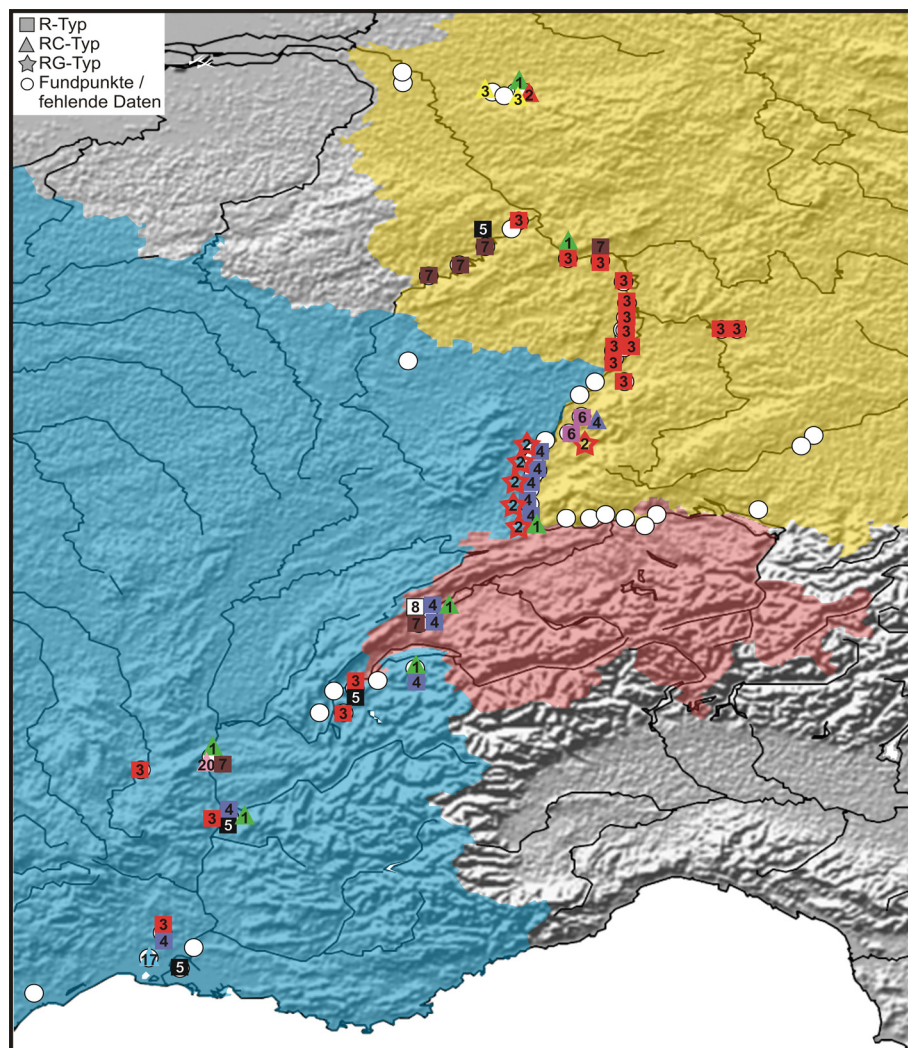


Abb. 23: Fundorte von *R. ridibunda*-spezifischen ITS2-Allelen in Süddeutschland, der Schweiz und Südfrankreich. Die häufigen Allele *R1* und *R2* sind nicht dargestellt, siehe dazu Abb. 20. Die Nummern ergeben zusammen mit den Symbolen die Bezeichnung des Allels.

Zwischen dem Rheinknie bei Basel und Karlsruhe wurden die mt-Genotypen *cf.rid-1* und *-3* gefunden. Der mt-Genotyp *cf.rid-1* konnte ausschließlich im südlichen Rheinabschnitt und in Anatolien nachgewiesen werden. Der mt-Genotyp *cf.rid-3* wurde in mehreren Populationen entlang des Oberrheins gefunden, darüber hinaus aber an keinem anderen Fundort.

Der mt-Genotyp *cf.rid-2* trat bei je einem Tier aus der Schweiz und vom Hochrhein (Deutsche Grenze zur Schweiz) auf. Es ist daher wahrscheinlich, dass Tiere mit diesem mt-Genotyp in der Schweiz ausgesetzt wurden und sich nachfolgend ausbreiteten.

Unklar ist der Status der entlang der Mosel gefundenen ITS2-Allele *R5* und *R7*. Innerhalb Deutschlands treten diese beiden Allele nur dort auf (*R7* bis Rheinknie bei Mainz). Darüber hinaus konnten die beiden Allele auch in der Schweiz und in Südfrankreich gefunden werden. Ihr Fehlen in Süddeutschland lässt Zweifel aufkommen, ob es sich bei diesen um autochthone Allele handelt. Darüber hinaus wurde an der Mosel auch der mt-Genotyp *cf.rid-6* nachgewiesen, was auf eine Beeinflussung durch anatolische Frösche hinweist. Das ITS2-Allel *R7* tritt sowohl zusammen mit dem balkanischen mt-Genotyp *rid-13b* als auch mit dem anatolischen *cf.rid-6* in verschiedenen Population auf, wodurch keine Hinweise auf ein mögliches Ursprungsgebiet dieses Allels vorliegen. Allein aus dem Verbreitungsmuster der Allele *R5* und *R7* ist deren Ursprung nicht zu erkennen.

Einige ITS2-Allele bzw. mt-Genotypen traten nur bei wenigen Tieren auf. Dazu zählt das Allel *R9*, das bei einem Tier in einer Fischzuchtanlage in Niemegk (Brandenburg) gefunden wurde. In dieser Populationen waren außer *R9*, mit fraglichem Status, keine Wasserfrösche mit genetischen Merkmalen allochthoner Individuen nachweisbar. In der Wasserfroschpopulation einer weiteren Fischzuchtanlage in Süddeutschland (Ettenheim) wurden die ITS2-Allele *RC4* und *R6* gefunden. Weitere, nicht autochthone Merkmale (*rid-5b*, *-9b*) in dieser Population sprechen für einen allochthonen Ursprung dieser beiden ITS2-Allele.

Da bei Einschleppungsereignissen die nukleären und mitochondrialen Genome allochthoner Individuen zusammen in die Zielpopulationen eingebracht werden, sollten auch beide Genome (in diesem Fall repräsentiert durch das mt ND3-Gen und das ITS2-Allel) in den betroffenen Populationen nachweisbar sein. Dieser Zusammenhang geht aus Abb. 24 hervor. Auch wenn in der überwiegenden Zahl der Populationen sowohl mitochondriale als auch nukleäre Genommerkmale allochthoner Individuen gefunden wurden, fehlen häufig die Nachweise allochthoner ITS2-Allele, obwohl allochthone mt-Genotypen auftreten. Dies kann auf unterschiedlich stark ausgeprägte genetische Differenzen zwischen den mt-Genotypen bzw. zwischen den Allelen des nukleären Markers zurückgeführt werden. Auf Grund geringer intraspezifischer Differenzen zwischen den ITS2-Allelen gelang es nicht, den Status aller ITS2-Allele als entweder autochthon oder allochthon zu bestimmen. Weiterhin können bei geringen Anteilen allochthoner Genomteile in den Populationen, bedingt durch die begrenzte Zahl untersuchter Tiere, die zusammen gehörenden Varianten nicht entdeckt worden sein.

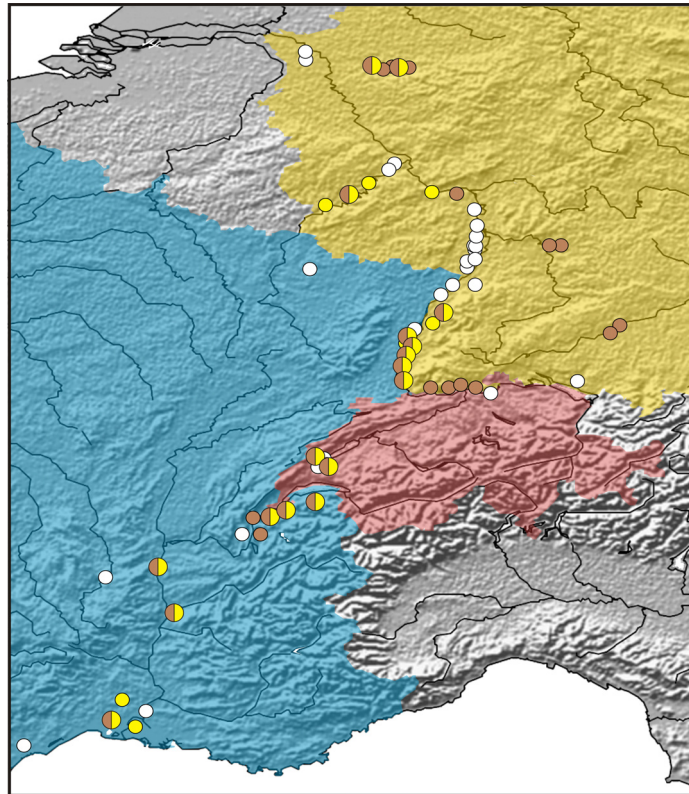


Abb. 24: Fundorte, an denen allochthone ITS2-Allele (gelb) bzw. allochthone mt-Genotypen (braun) nachgewiesen wurden. Weiß dargestellt sind Fundpunkte ohne Nachweise allochthoner Merkmalen oder fraglichem Status.

3.2.3 Häufigkeiten der genetischen Merkmale

Unter den 1511 Allelen im ITS2-Gesamtdatensatz befinden sich 922 Allele der *R. ridibunda*-Gruppe (61 %) sowie 548 Allele der *R. lessonae*-Gruppe (36,4 %). Der Großteil der *R. lessonae*-Allele stammt aus Deutschland, da unter den Vergleichsproben aus anderen Ländern fast ausschließlich *R. ridibunda* vertreten waren. In den Proben aus Deutschland finden sich die ITS2-Allele von 383 *R. ridibunda* und 439 *R. lessonae/R. bergeri* (46,6 bzw. 53,4 %). Im Vergleich dazu konnten im selben Datensatz die mt-Genotypen von 228 *R. ridibunda* und 183 *R. lessonae/R. bergeri* bestimmt werden (55,5 bzw. 44,5 %). Demnach liegen im Verhältnis mehr *R. ridibunda*-Mitochondrien (1 : 0,8) bzw. zu wenige *R. ridibunda* ITS2-Allele vor (1 : 1,15).

Die absoluten Zahlen der einzelnen in Deutschland nachgewiesenen mt-Genotypen liegen zwischen 1 und 173 (Abb. 25). Wird der mt-Genotyp von *R. bergeri* (*berg-1*) als ursprünglich eingeschleppt angesehen, beträgt der Anteil von Tieren mit allochthonen mt-Genotypen in Deutschland 46,5 %, anderenfalls sind es 18 %. Eine Differenzierung in allochthone und autochthone ITS2-Allele ist in fünf Fällen nicht eindeutig möglich, weshalb der Anteil der allochthonen Allele mit 7 bis 15,6 % angegeben werden muss. Die Anteile schwanken aber zwischen den Fundorten und Untersuchungsregionen erheblich (Tab. 7 und 8).

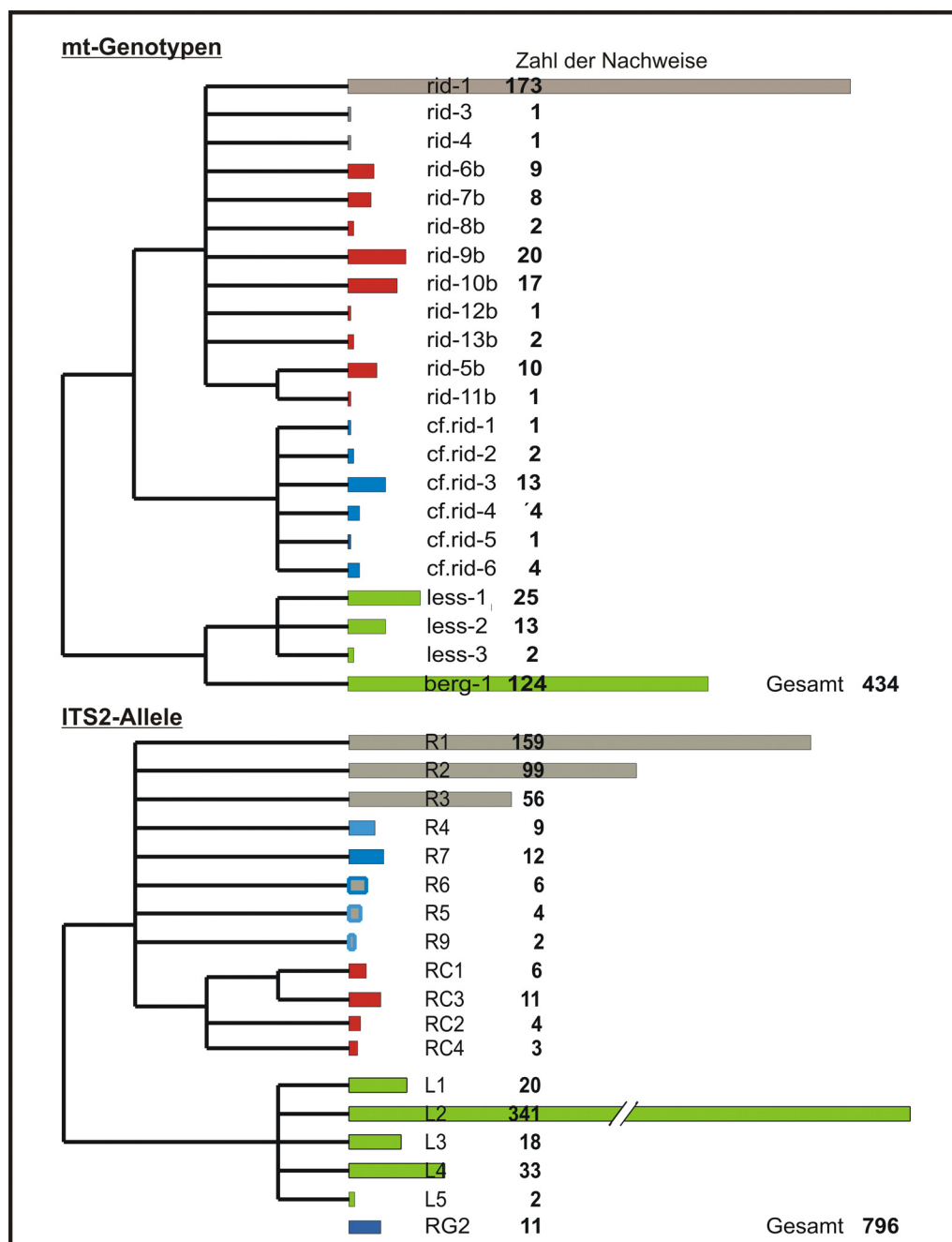


Abb. 25: MP-Stammbäume (*Strict Consensus* aus 95 bzw. 12 Bäumen) errechnet aus allen in Deutschland nachgewiesenen mt-Genotypen (oben) bzw. ITS2-Allelen (unten). Die an den Balken stehenden Zahlen geben die absoluten Häufigkeiten an. Farben der Balken: grün - *R. lessonae/R. bergeri*, grau - autochthone *R. ridibunda*, rot - balkanische *R. ridibunda*; blau - anatolische *R. ridibunda*; blau umrahmt - Status unklar, vermutlich anatolischen Ursprungs. Das ITS2-Allel RG2 wurde nicht in die Stammbaumberechnung aufgenommen, da die erhaltenen Sequenzen erheblich kürzer als das Gesamtalignment waren.

Die höchsten Anteile allochthoner mt-Genotypen und ITS2-Allele konnten im Ruhrtal gefunden werden. 26,7 % der dort vorkommenden ITS2-Allele und 54,8 % der mt-Genotypen haben ihren Ursprung vermutlich auf dem südlichen Balkan (Tab. 7 und 8). In drei Populationen gehen die *R. ridibunda*-spezifischen mt-Genotypen ausschließlich auf Aussetzungen balkanischer Wasserfrösche zurück (Tab. 8, Fundorte 3, 4 und 7).

In der Mosel Region (Fundorte 8-12) konnte nur ein allochthoner mt-Genotyp am Fundort Trittenheim (Nr. 11) nachgewiesen werden (*cf. rid-6*, Anteil 9,8 %). Eine exakte Einstufung der an der Mosel vorkommenden ITS2-Allele ist nicht eindeutig möglich. Sollten die ITS2-Allele *R5* und *R7* allochthon sein, läge der Anteil allochthoner Allele bei 19,7 %.

Hohe Anteile allochthoner *R. ridibunda*-Merkmale wiesen auch die Populationen am Oberrhein zwischen dem Rheinknie bei Basel und Karlsruhe auf (Fundorte 30-37). Die Werte für die mt-Genotypen bzw. ITS2-Allele betrugen 22,9 % bzw. 21,6 %. Nur das ITS2-Allel *R6* am Fundort 30 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Sofern dieses allochthon ist, würde sich der Anteil allochthoner ITS2-Allele allerdings nur um 1,9 % erhöhen. Im Oberrheinabschnitt traten balkanische mt-Genotypen bei 6 Tieren und anatolische bei 14 Tieren auf. Die Häufigkeit der mt-Genotypen anatolischer Wasserfrösche überwogen gegenüber denen balkanischer um das 2,8-fache. Bis auf eine Ausnahme gingen alle anatolischen mt-Genotypen auf die Variante *cf. rid-3* zurück, die an fünf der sieben Fundorte vorkam. Der große Einfluss anatolischer Individuen war auch an den ITS2-Allelen zu erkennen. An den Fundorten des Oberrheinabschnitts waren unter den allochthonen ITS2-Allelen die Varianten *R4* und *RG2* besonders häufig vertreten (91,6 %).

Unter den 118 vom Rheinabschnitt um Karlsruhe gewonnenen Proben (Fundorte 15-23 und 26-28) betrug der Anteil des für *R. bergeri*-spezifischen mt-Genotyp (*berg-1*) 95,8 % (Tab. 8). Weitere allochthone mt-Genotypen konnten dort nicht gefunden werden. Allerdings könnte das Auftreten des ITS2-Allels *R3* in dieser Region von Bedeutung sein. Es handelt sich dabei um das einzige in dieser Region nachgewiesene *R. ridibunda*-Allel. Auch wenn das *R. lessonae*-Allel *L2* mit Abstand am häufigsten vorkommt (78,1 %), tritt das Allel *R3* bei fast jedem dritten Tier in dieser Region auf (ausschließlich heterozygot).

Der mt-Genotyp von *R. bergeri* (*berg-1*) konnte in einer weiteren Population nördlich des Bodensees (Fundort 42) bei allen dort untersuchten Tieren (10) gefunden werden. Die kürzeste, für Wasserfrösche passierbare Verbindung zwischen den beiden Fundgebieten stellt der Rhein selbst dar. Unter den 111 zwischen dem Bodensee und Karlsruhe entlang des Rheins untersuchten Tieren befand sich allerdings nur ein Individuum (Fundort 33), welches den mt-Genotypen *berg-1* aufwies. Die diskontinuierliche Verbreitung könnte sowohl durch separate Aussetzungen als auch durch natürliche Arealverschiebungen mit der Bildung von Reliktpopulationen erklärt werden.

Tab. 7: Nachgewiesene ITS2-Allele in den untersuchten deutschen und schweizer Populationen. Die Bezeichnungen der Allele ergeben sich aus den Buchstaben und den Nummern unterhalb. Die p-Werte geben Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Ablehnung der Nullhypothese (Genotypen der Population nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) an (χ^2 -Test). Fett gekennzeichnet wurden signifikante Abweichungen von der Hardy-Weinberg-Erwartung. N - Zahl der Allele. n.b. - nicht bestimmt.

ITS2-Allele																									
Nr	Fundort	p-Wert	N	L							R									RC				RG	n.b.
				1	2	3	4	5	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	2		
1	Flüren (R.)	0,435	14	5	9																				
2	Flürener Altrhein	0,318	10	3	7																				
3	Hattingen (Ru.)	0,360	20		3					2	3									4				8	
4	Witten (Ru.)	0,612	12		1					6	5														
5	Heisingen (Ru.)	0,691	26		5					6	3								1	4	7				
6	Kemnader See	0,855	20		1					8	9													2	
7	Lottental	0,004	12		10						2														
8	Koborn (M.)		2							2															
9	Dieblich (M.)	0,872	34							11	15	8													
10	Pünderich (M.)	0,887	22							10	4			4		2								2	
11	Trittenheim (M.)	0,482	20	6	2					5	2					5									
12	Kenn (M.)																								
13	Bingen (R.)	0,014	28		11					1	5	6						3						2	
14	Ingelheim (R.)	0,001	28		19			2		2	3	1				1									
15	Guntersblum(R.)	0,999	22		19	1						2													
16	Gernsheim (R.)	0,428	30		22							8													
17	Altrip (R.)	0,971	30	1	19	5						5													
18	Philippsburg (R.)	0,651	20		15							5													
19	Rheinsheim (R.)	0,798	20		16							4													
20	Rußheim		2		2																				
21	Speyer		16		16																				
22	Wörth (R.)	0,075	22	1	10							11													
23	Wörth (R.)	0,997	26		22	2						2													
24	Neuenstadt (K.)	0,851	12		1					2	3	2												4	
25	Gochsen (K.)		6		1					4		1													
26	Eggenstein	0,986	20		17							1												2	
27	Rheinmünster	0,684	30		24	6																			
28	Lichtenau (R.)	0,971	20		18	2																			
29	Ettenheim	0,262	28		5		7			6	1				4						3			2	
30	Weisweil																								
31	Jechtingen (R.)		2				2																		
32	Jechtingen (R.)	0,030	28		2		4			10	10		1										1		
33	Breisach (R.)	0,968	24		8		3			10	1		1										1		
34	Hartheim (R.)	0,310	26		5					10	7		1										3		
35	Bremgarten (R.)	0,085	34		15		4			5	4		2										2	2	
36	Steinstadt (R.)	0,748	22				1			11	6		2											2	
37	Efringen-Kirchen	0,252	24				6			3			2					2					1	10	
38	Wehra / Rhein		2				1			1															
39	Albbruck		2				2																		
40	Waldschut (R.)	0,163	22				3			11														8	
41	Lienheim (R.)		4		1					1	2														
42	Eriskirch	0,999	20		17	2				1															
43	Dellemsingen	0,670	14		10					4															
44	Donau-Stetten																								
45	Niemegk / BB	0,411	40	4						26	8						2								
46	CH / Arnex	0,435	10								4													6	
47	CH / Bavois		28							1	9		1			2	3							12	
48	CH / C. de T.		24							4	3		4				2		1					10	
49	CH / Penthaz		6																					6	
50	CH / Dätwil-G.		2						2																
	Summe		910	20	34	18	33	2	2	16	11	56	14	4	6	14	5	2	7	4	11	3	11	78	

CH-Schweiz, R.-Rhein, Ru.-Ruhr, M.-Mosel, BB-Brandenburg, K.-Kocher, C. de T.-Creux de Terre.

Tab. 8: Nachgewiesene mt-Genotypen (ND3) in den untersuchten deutschen und schweizer Populationen. Die Bezeichnungen der mt-Genotypen ergeben sich aus den Buchstaben und den Nummern unterhalb. n - Zahl der untersuchten Individuen. n.b. - nicht bestimmt.

Mt-Genotypen																												
Nr	Fundort	n	less			berg	rid			rid-b										cf.rid						n.b.		
			1	2	3		1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6				
1	Flüren (R.)	7	5		1																							1
2	Flürener Altrhein	5	4		1																							
3	Hattingen (Ru.)	10	1								6				3													
4	Witten (Ru.)	6	1									3			2													
5	Heisingen (Ru.)	13					9				1				2													1
6	Kemnader See	10					8					1			1													
7	Lottental	6													4	2												
8	Kobern (M.)	1					1																					
9	Dieblich (M.)	17					17																					
10	Pünderich (M.)	11					11																					
11	Trittenheim (M.)	10	1				4																		4			1
12	Kenn (M.)	4					4																					
13	Bingen (R.)	14					11		1																			2
14	Ingelheim (R.)	14					10	1								1			2									
15	Guntersblum(R.)	11	3			8																						
16	Gernsheim (R.)	15				12																						3
17	Altrip (R.)	15				13																						2
18	Philippsburg (R.)	10				6																						4
19	Rheinsheim (R.)	10				10																						
20	Rußheim	1				1																						
21	Speyer	8				7	1																					
22	Wörth (R.)	11				10																						1
23	Wörth (R.)	13				13																						
24	Neuenstadt (K.)	6					4					2																
25	Gochsen (K.)	3										3																
26	Eggenstein	10				10																						
27	Rheinmünster	15				14																						1
28	Lichtenau (R.)	10				9	1																					
29	Ettenheim	14					2				3				8	1												
30	Weisweil	4					4																					
31	Jechtingen (R.)	1					1																					
32	Jechtingen (R.)	14					8									1							5					
33	Breisach (R.)	12				1	11																					
34	Hartheim (R.)	13					8					2											3					
35	Bremgarten (R.)	17					14					1											2					
36	Steinstadt (R.)	11					10																1					
37	Efringen-Kirchen	12					7					2								1		2						
38	Wehra / Rhein	1																			1							
39	Albbruck	1										1																
40	Waldschut (R.)	11										1			10													
41	Lienheim (R.)	2					1					1																
42	Eriskirch	10				10																						
43	Dellemsingen	7	6												1													
44	Donau-Stetten	4					2						2															
45	Niemegk / BB	20	4	13																								3
46	CH / Arnex	5					5																					
47	CH / Bavois	14					11										1	1			1							
48	CH / C. de T.	12					5								1								4	1				1
49	CH / Penthaz	3					3																					
50	CH / Dätwil-G.	1																										1
	Summe	455	25	13	2	124	173	1	1	10	9	8	2	20	17	1	1	2	1	2	13	4	1	4				21

CH-Schweiz, R.-Rhein, Ru.-Ruhr, M.-Mosel, BB-Brandenburg, K.-Kocher, C. de T.-Creux de Terre.

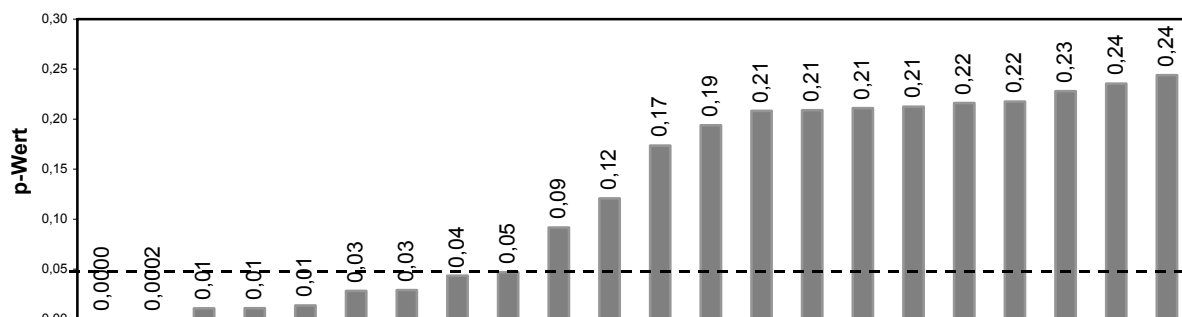
3.2.4 Populationsgenetische Analysen der einheimischen Populationen

Mittels des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWG) wurden Erwartungswerte für die Häufigkeiten von Allelkombinationen berechnet und diese mit einem χ^2 -Test hinsichtlich signifikanter Abweichungen von den beobachteten Werten analysiert (Tab. 7). Der Test wurde für alle Populationen durchgeführt, aus denen wenigstens sechs Proben vorlagen. Signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht konnten in vier Populationen festgestellt werden. Die Abweichung vom HWG der Population am Fundort 7 (Lottental) ist darauf zurückzuführen, dass in der kleinen Stichprobe ($n = 6$) keine heterozygoten Kombinationen zwischen den (autochthonen) Allelen auftraten (siehe auch Anhang 1). In den Populationen aus dem Rheinknie bei Mainz (Fundorte 13 und 14) beruhen die Abweichungen darauf, dass seltene Allele homozygot auftraten ($L5$, $RC1$), was bei freier Panmixie unwahrscheinlich ist. Hinzu kommt, dass in beiden Populationen das Allel $R3$ vorkam, welches stets nur heterozygot auftrat. Bei der Population vom Fundort 32 (Jechtingen) ist höchstwahrscheinlich die Einschleppung allochthoner Formen für die signifikante Abweichung vom HWG verantwortlich, da dort der Genotyp $R4/RG2$ auftrat, obwohl beide Allele nur einmal in der Population nachgewiesen werden konnten.

Die 18 in Deutschland verbreiteten ITS2-Allele traten in 86 verschiedenen Kombinationen (Genotypen) auf. Um Aussagen treffen zu können, ob bestimmte Allelkombinationen von den erwarteten Häufigkeiten abweichen, wurden zunächst die Erwartungswerte für alle Populationen einzeln berechnet. Die aus den einzelnen Populationen ermittelten Werte für die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten jeder Allelkombination wurden dann aufsummiert und verglichen (Abb. 26). Auf diese Weise konnten Verzerrungen auf Grund der geringen Stichprobengrößen aus den einzelnen Populationen verringert werden.

Neun Allelkombinationen zeigen signifikante Abweichung von den erwarteten Häufigkeiten. Dazu zählen die homozygoten Varianten $L4/L4$ und $R2/R2$, die deutlich häufiger auftraten als erwartet und die Variante $R3/R3$, die nicht vorkam, obwohl wenigstens sechs homozygote Individuen erwartet werden konnten. Demgegenüber tritt die Kombination $R3/L2$ deutlich öfter als erwartet auf. Daher wird für das *R. ridibunda*-Allel $R3$ die Kopplung mit genetischen Faktoren angenommen, wodurch diese Tiere im Falle des homozygoten Auftretens ($R3/R3$) in einem frühen Entwicklungsstadium absterben. Andere Verschiebungen in den Häufigkeiten der Allelkombinationen können auf verschiedene Paarungspräferenzen zurückgehen. Die selten auftretenden Kombinationen wie z. B. $L2/R2$, können auf die Wirkung prä- oder postzygoter Isolationsmechanismen hindeuten. Allerdings entspricht die Häufigkeit $L2/R1$ dem Erwartungswert.

In Tabelle 9 wurden die Häufigkeiten der Kombinationen von mt-Genotypen und ITS2-Allelen aller in Deutschland gefunden Tiere eingetragen. Darin wurden sowohl die Kombinationen bei den Individuen, als auch gemeinsame Vorkommen von mitochondrialen und nukleären Varianten in denselben Populationen angegeben. Es wurde erwartet, dass in vielen Populationen bzw. bei einzelnen Individuen ursprünglich gemeinsame allochthone Merkmale auftreten.



A1	L5	L4	R3	R2	L2	RC4	RG2	L1	L2	RC1	RC2	RC3	RC1	R4	L1	L4	RC1	L4	L2	L1	L5	L4
A2	L5	L4	R3	R2	R2	R6	R4	L1	R3	RC1	RC2	RC1	R1	R2	R7	R4	R4	L2	RC1	R2	L2	R1
fb	1	9	0	22	6	2	2	5	41	1	1	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0	6
fe	0,0	2,8	6,5	12,9	15,8	0,5	0,5	2,1	30,1	0,2	0,2	0,3	0,8	1,6	1,6	1,6	0,3	4,7	1,5	1,5	1,4	9,6
p	0,65	0,64	0,50	0,50	0,54	0,30	0,34	0,37	0,30	0,46	0,27	0,56	0,30	0,44	0,28	0,62	0,84	0,91	0,78	0,86	0,58	0,62
A1	R7	L2	RC3	RG2	R5	RC3	L2	RG2	L4	R7	L2	R7	R4	R3	L1	R3	L2	L3	L2	R1	R2	L2
A2	R7	R4	R2	R2	R1	R1	RC3	R1	R2	R2	RG2	R1	R1	R1	R1	R2	L1	L2	R1	R1	R1	L2
fb	2	1	1	1	3	4	1	4	1	4	1	2	5	5	2	7	7	15	18	32	31	121
fe	1,5	1,6	1,9	1,9	2,1	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,8	3,0	3,1	3,6	4,2	5,8	7,6	14,6	19,2	31,0	34,2	116

Abb. 26: Ergebnisse der Signifikanztests (χ^2) zum Vergleich der beobachteten (fb) und erwarteten (fe) Häufigkeiten von ITS2-Allelkombinationen (A1/A2) in den deutschen Populationen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von 0,05 (5 %). In der unten stehenden Tabelle sind die Allelkombinationen mit den höchsten Erwartungswerten und deren Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) angegeben. Hervorgehobene Allelkombinationen werden im Text erwähnt (fett).

Tab. 9: Kombinationen von mt-Genotypen und ITS2-Allelen für die in Deutschland gesammelten Proben. Fett: Kombinationen der mt-Genotypen mit den zwei ITS2-Allelen desselben Individuums, normal: Zahl der Populationen, in denen die mt-Genotypen und ITS2-Allele zusammen vorkamen. Rot dargestellt sind autochthone ITS2-Allele und mt-Genotypen.

ND3	rid			rid-b							cf.rid				less			berg
ITS2	1	3	4	5	6	7	8	9	10	13	1	2	3	6	1	2	3	1
L1	4:1								1					2:1	11:5	8:3	1:2	2:2
L2	63:14	1:1	2:1	3:3	3:4	3:3	3:1	11:6	10:6	3:1			3	1	39:8	4:4	3:2	197:13
L3	1																	16:5
L4	17:7			1:1		2:4		6:1	3:3		1	1:1	3:4					
L5	2:1	1							1	1								
RG2	11:6					3			1		1		4					
RC1	4:3		1	1		1		1			1		1:1					
RC2	4:1			1				1										
RC3	3:1			3:2				3:2							1			
RC4	1			2:1				1:1	1									
R1	75:17	1		4:2	10:4	6:4		6:4	9:5	1:1	1	1:1	10:5	3:1	6:4	17:1		1:1
R2	57:17	1:1	1	1:3	2:3	1:3	1:1	10:6	5:5	1			12:4	1	8:5	5:2		
R3	14:4	1	1		3:2				1:1	1					1:1			30:8
R4	9:5					2			1		1		4					
R5	4:1																	
R6	3:2			2:1				1:1	1									
R7	7:4	1							1	1				3:1	1:1			
R9															1:1	1:1		

Wegen den Hybridisierungen allochthoner Formen mit einheimischen Tieren können häufige, autochthone mt-Genotypen (*rid-1*) bzw. ITS2-Allele (*R1*, *R2*, *L2*) in fast allen Kombinationen sowohl auf Individuen- als auch auf Populationsebene gefunden werden.

Bemerkenswert ist, dass die ITS2-Allele *RC3* und *RC4* nur bei Individuen bzw. in Populationen mit den mt-Genotypen *rid-5b* und *rid-9b* vorkommen. Das ITS2-Allel *R6*, dessen Status fraglich ist, wurde nur zusammen mit balkanischen mt-Genotypen gefunden. Das Allel *R7* wiederum konnte fast ausschließlich in Kombination mit anatolischen mt-Genotypen nachgewiesen werden (und mit den wahrscheinlich autochthonen mt-Genotypen *rid-3* und *rid-10b*).

Unter den *R. lessonae*-spezifischen ITS2-Allelen lag das Allel *L4* nie in Kombination mit einem *R. lessonae*-spezifischen mt-Genotypen vor, obwohl dieses Allel mit 33 Nachweisen noch häufiger als *L1* und *L3* ist.

3.2.5 Differenzierung der genetischen Merkmale

Zusammenfassend werden noch einmal die grundlegenden Kriterien dargelegt, die zur Abgrenzung allochthoner Genommerkmale genutzt werden können (Tab. 10). Da die Zuordnungen der mt-Genotypen auf Grund von phylogenetischen Beziehungen mit größerer Sicherheit möglich war, konnte das Vorkommen allochthoner mt-Genotypen in bestimmten Populationen als zusätzliches Kriterium für die Einteilung der ITS2-Allele genutzt werden.

Als autochthon können mit hoher Wahrscheinlichkeit die ITS2-Allele *R1*, *R2* sowie die mt-Genotypen *rid-1*, *rid-4* und *rid-10b* gelten. Neben den ITS2-Allelen *R5*, *R7* und *R9* haben das *R. ridibunda*-Allel *R3* und der mt-Genotyp *berg-1* einen fraglichen Status. Obwohl 64 % aller Nachweise des Allels *R3* aus Populationen vorliegen, in denen der mt-Genotyp von *R. bergeri* auftritt, bleibt ein gemeinsamer Ursprung fraglich, da auch in Populationen, die ausschließlich *R. ridibunda* mt-Genotypen aufwiesen, hohe Anteile dieses Allels (bis 23,5 %) gefunden wurden (Tab. 7 und 8, Fundorte 9 und 13). Deutlicher scheint ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des *R. lessonae*-Allels *L3* und dem mt-Genotyp *berg-1*. Dieses Allel kam nur in Populationen mit hohen Anteilen (72,7-100 %) des mt-Genotyps *berg-1* vor. Nach den Ergebnissen phylogenetischer Analysen unterscheidet sich das Allel *L3* von einheimischen *R. lessonae* Allelen und weist Ähnlichkeiten zu südeuropäischen Varianten auf (Abb. 16 und 17). Eine gemeinsame Zugehörigkeit von *L3* und *berg-1* zu *R. bergeri* ist aber demnach möglich.

Werden die verfügbaren genetischen Informationen zusammen betrachtet, scheint es sehr wahrscheinlich, dass alle Allele des *RC*-Typs in Deutschland und Frankreich allochthonen Ursprungs sind.

Tab. 10: Informationen zur Einteilung der in Deutschland gefundenen mt-Genotypen und ITS2-Allele der *R. ridibunda*-Gruppe und *R. bergeri* nach dem angenommenen Ursprung. Farben: grau - allochthon, schraffiert - Status unklar.

Mt-Genotypen															
	rid			rid-b						cf.rid					berg
autochthon	1	4	3						10						1
allochthon				5	6	7	8	9		13	1	2	3	6	
1. Verwandtschaft mit															
Genotypen vom Balkan				X	X	X	X	X	X	X					
Genotypen aus Anatolien											X	X	X	X	
Genotypen aus Italien															X
2. Verbreitung															
nur in Deutschland		X			X	X	X	X		X			X		
auch in Nord- und Osteuropa	X								X						
auch in Südeuropa	X			X					X						
auch in Griechenland									X						
auch in Anatolien											X			X	
auch in der Schweiz	X								X			X			
auch in Frankreich	X		X	X					X					X	
auch in Italien															X
3. Häufigkeit der Nachweise															
> 50	X														X
> 10								X	X				X		
< 10		X	X	X	X	X	X			X	X	X		X	

ITS2-Allele													
	R								RC				RG
autochthon	1	2	3		5	6	7	9					
allochthon				4					1	2	3	4	2
1. Verwandtschaft mit													
Genotypen vom Balkan									X	X	X	X	
Genotypen aus Anatolien	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X
2. Verbreitung													
nur in Deutschland						X		X		X	X	X	X
im Ruhrtal										X	X		
auch in Nachbarstaaten	X	X											
auch in Südeuropa	X	X											
auch in Griechenland													
auch in Anatolien		X		X									
auch in der Schweiz	X	X		X			X		X				
auch in Frankreich	X	X	X	X	X		X		X				
Nachweis in Fischzuchtanlage								X					
3. Häufigkeit der Nachweise													
> 50	X	X											
> 10			X				X						X
< 10				X	X	X		X	X	X	X	X	

3.3 Kreuzungsexperimente

Die Kreuzungen wurden in drei aufeinander folgenden Jahren durchgeführt. Nur in einem Jahr konnten Nachkommen aus allen drei Kreuzungsvarianten erhalten und parallel aufgezogen werden. Die Zahl der beobachteten Tiere lag bei den Freilandaufzuchten zwischen 19 und 40 (Anhang 3), im Labor wurden zwischen 18 und 20 Tiere je Kreuzungsvariante untersucht. Die Wassertemperatur in den Aufzuchtbehältern betrug im Labor annähernd konstant 25°C. Im Freiland lagen die Werte zwischen 14 und 20°C mit einem Mittelwert von 17,1°C.

3.3.1 Vergleich der Larvenmassen

In Abbildung 27 sind die Entwicklungen der durchschnittlichen Larvenmassen aller drei Kreuzungsvarianten für die Aufzuchten im Labor und im Freiland dargestellt. Im Vergleich zu den Nachkommen der homotypischen Kreuzungen (autochthon x autochthon und allochthon x allochthon) zeigte die Entwicklung der Hybriden im Freiland noch deutlich stärkere Unterschiede als im Labor zu beobachten waren. Obwohl die Larvenmassen der heterotypischen Kreuzungsvariante (autochthon x allochthon) gegenüber den homotypischen Kreuzungen offensichtlich schneller anwachsen, beruhen die Unterschiede jedoch nicht auf einer durchgehend höheren Wachstumsrate der Hybriden.

Um die Daten besser vergleichen zu können, wurden die Wertereihen linearisiert. Zur Ermittlung der optimalen Funktion, an Hand derer die Linearisierungen erfolgen konnten, wurden Regressionsmodelle für alle sechs Datenreihen (aus Abb. 27) errechnet und verglichen. Eine Exponentialfunktion der allgemeinen Form $Y = e^{(a+bx)}$ spiegelte die Funktionsverläufe am besten wider. Die Bestimmtheitsmaße (R^2) für die Anpassung von Exponentialfunktionen an die Wertereihen aus Abb. 27 lagen zwischen 0,969 und 0,994 (Ø 0,985) (im Vergleich dazu für lineare Regressionsgeraden zwischen 0,821 und 0,915, Ø 0,869). Somit kann von einer exponentiellen Entwicklung der Körpermassen ausgegangen werden.

Durch Logarithmieren konnten die Messwerte in eine lineare Funktion der Form $\ln Y = a + bx$ transformiert werden. Zu den linearisierten Messwerten wurden erneut Regressionsgeraden errechnet und auf signifikante Unterschiede hinsichtlich deren Anstiege und Schnittpunkte mit der y-Achse untersucht (Abb. 28). Die Regressionsgeraden der Labor- und Freilandaufzuchten jedes Kreuzungstyps verlaufen annähernd parallel mit unterschiedlichen Schnittpunkten der Y-Achse und zeigen keine signifikanten Abweichungen in den Anstiegen (F-Test). Daraus kann gefolgert werden, dass die Massenzunahme im Freiland bzw. im Labor um jeweils einen konstanten Faktor (a) verschieden sind. Die unterschiedlichen Werte für a können als differierende Effizienzen gleicher physiologischer Grundausstattungen (Enzymsysteme) bei verschiedenen Temperaturen angesehen werden. Werden die Anstiege der Geraden zwischen den Kreuzungstypen miteinander verglichen, treten zwischen allen paarweisen Vergleichen signifikante Unterschiede (F-Test) auf.

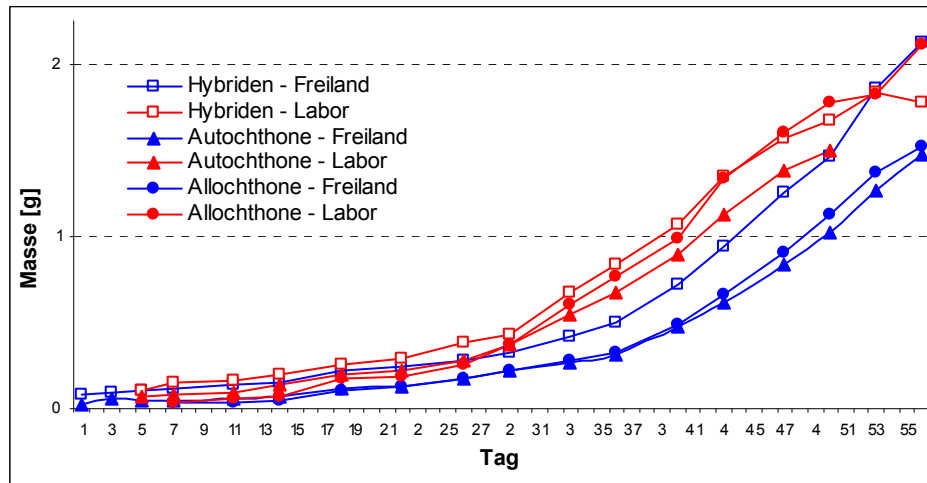


Abb. 27: Massenentwicklung der Larven bis zur Metamorphose. Blau: Durchschnittsgewichte der Aufzuchten im Freiland, rot: Aufzuchten im Labor.

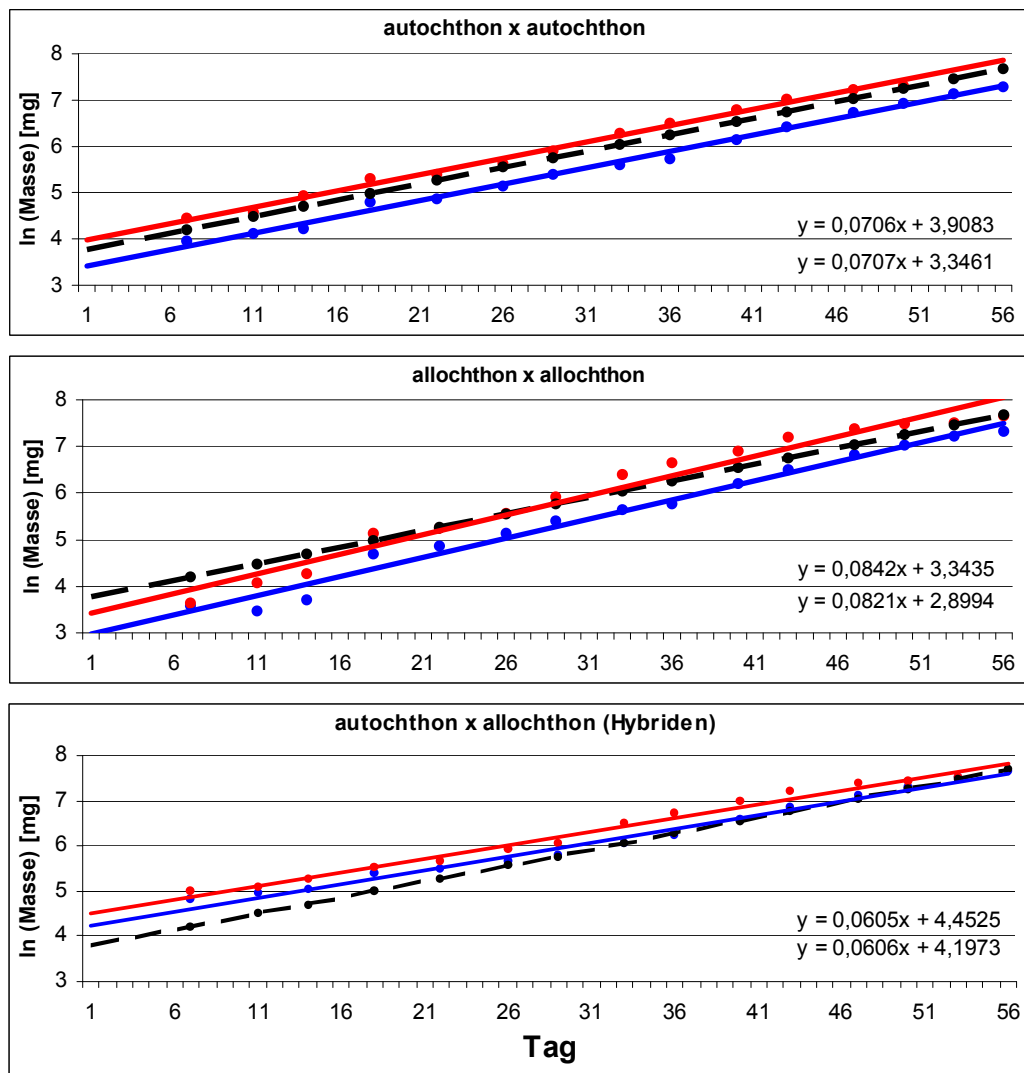


Abb. 28: Massenentwicklung der Larven im Beobachtungszeitraum. Die gestrichelte Gerade ist zum Vergleich eingetragen.

Freiland — Labor —

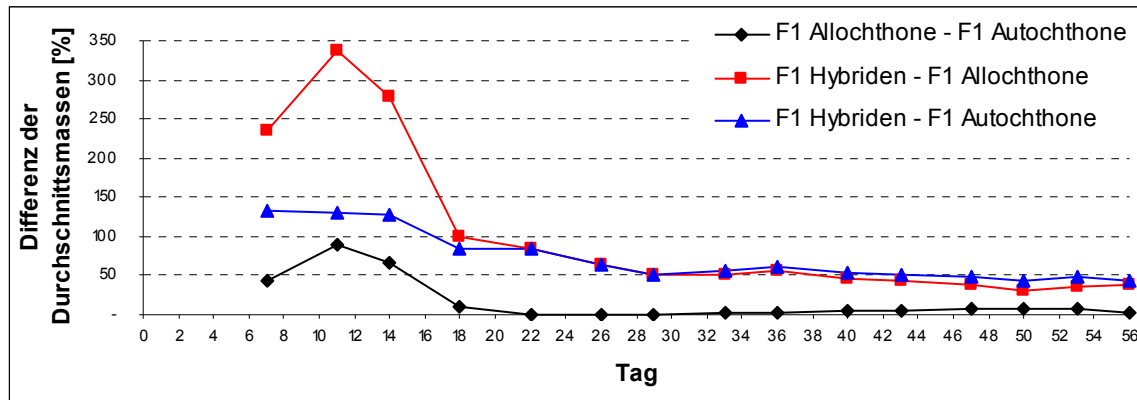


Abb. 29: Differenzen der durchschnittlichen Körpermassen zwischen den F1-Individuen der drei Kreuzungstypen. Die Werte stammen von den Tieren aus Freilandaufzuchten.

Dafür könnten differierende Funktionen der Enzymsysteme verschiedener Kreuzungstypen mit unterschiedlichen genetischen Grundausstattungen (Genotypen) ursächlich sein.

Die Körpermassen unterschieden sich vor allem am Beginn der Larvalphase (Abb. 29). Zum Ende des Beobachtungszeitraums gleichen sich die Differenzen zwischen den Körpermassen immer weiter an (Abb. 29). Die in Abb. 27 erkennbare schnellere Zunahme der Lebendmassen der Hybriden im Freiland geht demnach auf einen Entwicklungsvorsprung zurück, der während der ersten ca. 14 Tagen nach dem Schlupf bestand. Die Ursache für diese anfänglich beschleunigte Entwicklung und spätere Abnahme der Massendifferenzen ist nicht bekannt.

3.3.2 Vergleich der Entwicklungsstadien

Die durchschnittlichen Entwicklungsstadien der Larven waren im Labor zu allen Zeitpunkten der Erfassung höher als im Freiland, was auf eine raschere Entwicklung bedingt durch die im Labor herrschenden höheren Temperaturen zurückzuführen ist (Abb. 30).

Die Entwicklungsstadien der Larven wiesen zu den meisten Beobachtungszeitpunkten (77,3%) signifikante Unterschiede zwischen den Kreuzungsvarianten auf (Mann-Whitney U-Test, zweiseitig, $\alpha=0,05$). Bei den im Freiland aufgezogenen Larven ergaben lediglich die Vergleiche zwischen den beiden homotypischen Kreuzungsvarianten am Tag 26 und 50 keine signifikanten Unterschiede. Im Labor zeigten die Tiere keine so stark ausgeprägten Differenzen der Entwicklungsstadien, was an den höheren Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werten bei Ablehnung der Nullhypothese, dass die beobachteten Entwicklungsstadien von Larvengruppen der gleichen Grundgesamtheit entstammen) erkennbar war. So wurden zwischen den Hybriden und den Nachkommen der autochthonen Kreuzung nach dem Tag 18 keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt, wobei die aus den U-Tests erhaltene Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,40 am Tag 26 auf 0,89 am Tag 50 anstieg. Am Tag 50 konnten auch zwischen den beiden homotypischen Kreuzungen bei den Laboraufzuchten keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt werden.

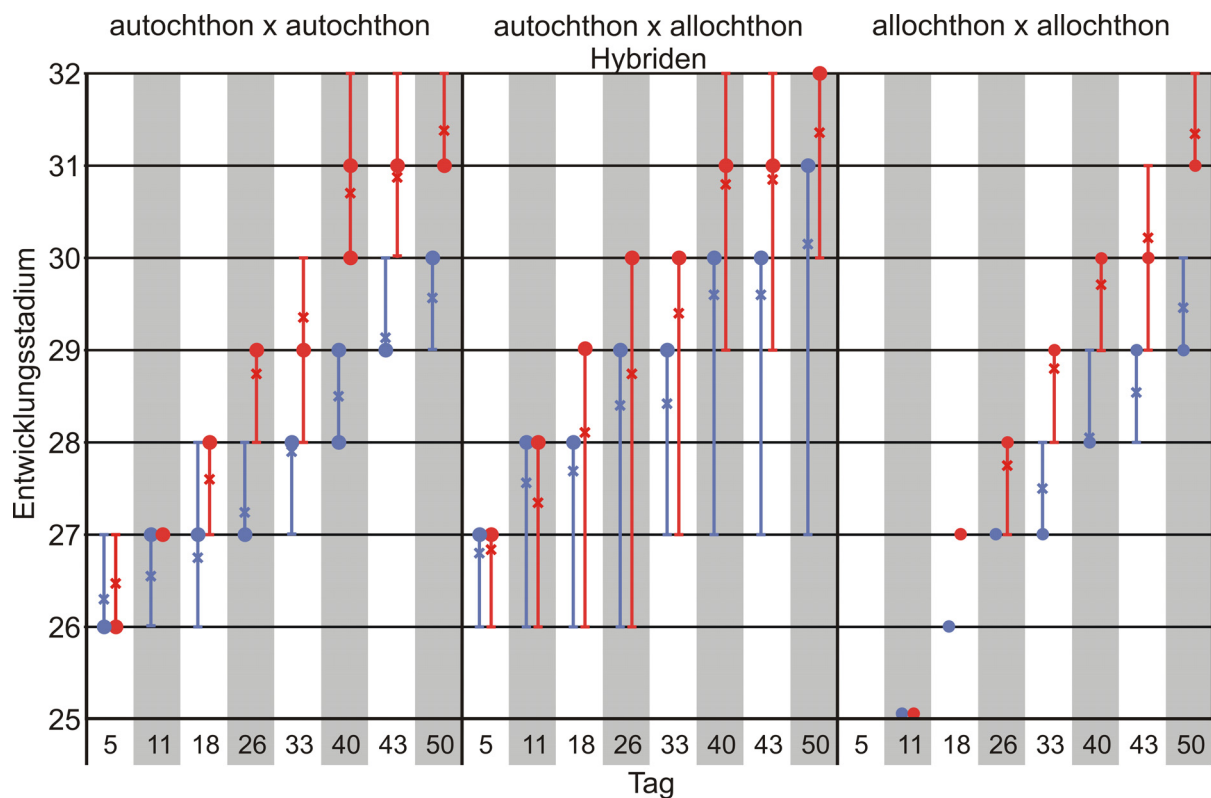


Abb. 30: Entwicklungsstadien der Larven zu verschiedenen Zeitpunkten (eingestuft nach GÜNTHER 1990). Blau: Freilandaufzuchten, rot: Laboraufzuchten. Punkte: Modalwerte, Kreuze: Mittelwerte, Linien: Streuung der Werte. Im Anhang 3 sind die Einzelwerte und Standardabweichungen aufgeführt.

Alle anderen paarweisen Vergleiche ergaben signifikante Unterschiede in den Entwicklungsstadien zu den jeweiligen Zeitpunkten. Unter den Hybridenlarven wurde eine ausgeprägte Varianz der Entwicklungsstadien beobachtet. So waren z. B. am Tag 26 unter den Hybriden-Larven ($n=34$) in der Freilandaufzucht vier verschiedene Entwicklungsstadien vertreten, wogegen unter den beiden homotypischen Kreuzungsvarianten nur ein bis zwei Stadien vorkamen (Abb. 30 und Anhang 3). Bis zum Tag 50 erhöhte sich die Zahl noch auf fünf Entwicklungsstadien gegenüber zwei bei den homotypischen Kreuzungen. Die mittlere Standardabweichung der Entwicklungsstadien unter den Hybriden betrug im Freiland 0,76 gegenüber 0,44 (Autochthone) und 0,25 (Allochthone) bei den beiden homotypischen Kreuzungen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die deutlich höhere Varianz der Entwicklungsstadien unter den Hybriden gegenüber den rein autochthonen und allochthonen Nachkommen, auf unterschiedlich ausgeprägte genetische Kompatibilitäten bei der Einkreuzung allochthoner Formen in autochthone Linien hindeuten. Sind die allochthonen Formen genetisch gut kompatibel, kann mit Heterosisseffekten gerechnet werden, die zu einer vergleichsweise schnellen Entwicklung der Jungtiere sowie deutlich höheren Körpermassen zum Zeitpunkt der Metamorphose führten.

3.4 Nachweise der Chytridiomykose

Insgesamt wurden 46 an Chytridiomykose erkrankte Tiere gefunden. 21 positive Nachweise erfolgten bei Tieren, die aus Populationen entlang des Rheins, der Mosel und der Ruhr stammten, wobei speziell im Ruhrtal in vier von fünf Populationen Nachweise von *B. dendrobatidis* erbracht werden konnten (Tab. 11).

Die Prävalenz des Erregers (Anteil der befallenen an den untersuchten Tieren) betrug im Ruhrtal 31,1 %. Weitere Nachweise liegen aus dem Rheinknie bei Bingen, dem Leopoldskanal bei Offenburg und aus Neuwied vor. Damit konnte der Pilz in Deutschland in 7 von 46 untersuchten Populationen (15,2 %), mit einer Gesamtprävalenz von 6,3 % gefunden werden.

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des Pilzes und dem Auftreten allochthoner Wasserfrösche, da in allen oben genannten deutschen Populationen Wasserfrösche gefunden wurden, die genetische Merkmale balkanischer Wasserfroschformen aufwiesen. Die Hypothese, wonach *B. dendrobatidis* durch allochthone Wasserfroschformen nach Deutschland eingeschleppt wurde, wird auch dadurch gestützt, dass sich unter 356 getesteten griechischen Wasserfröschen 11 infizierte Tiere (3,1 %) befanden.

Tab. 11: Ergebnisse der Chytridiomykose-Nachweistests. Aufgeführt sind nur die Fundorte, an denen infizierte Wasserfrösche nachgewiesen wurden. In Klammern sind die Nummern der Fundorte angegeben, Seq - sequenzierte PCR-Produkte.

Land	Fundort	getestete Proben	positive Proben	Anteil [%]	Seq
Deutschland	Lottental (7)	6	2	33,3	1
	Heisinger Aue (5)	12	2	16,7	2
	Witten (4)	2	2	100	1
	Winz-Hattingen	10	8	80	5
	Leopoldskanal	4	4	100	2
	Bingen (13)	6	2	33,3	1
	Neuwied ¹	1	1	100	1
Aus Deutschland insgesamt		331	21	6,3	13
Griechenland	Skala (124)	109	10	9.2	3
	Lesvos ¹	1	1	100	1
Aus Griechenland insgesamt		356	11	3,1	4
Schweiz	See bei Zürich ¹	6	5	83.3	3
Peru ¹		2	2	100	1
USA ²		5	5	100	2
Terrarientiere ¹		3	2	66,7	1
Insgesamt getestet		694	46	6,6	24

¹ - Proben sind nicht in Anhang 1 aufgeführt.

² - Isolierte DNA von *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Unter den insgesamt 37 Proben, die aus Populationen stammten in denen *B. dendrobatidis* nachgewiesen wurde, konnte kein gehäuftes Auftreten der Infektion bei homozygoten bzw. heterozygoten Individuen festgestellt werden (χ^2 -Test, $p=0,41$; Tab. 12). Ebenso waren auch Allochthone bzw. Hybriden zwischen allochthonen und autochthonen Individuen und rein autochthone Tiere gleichermaßen betroffen ($p=0,72$).

Tab. 12: Anteile *B. dendrobatidis*-positiver Proben unter Individuen verschiedenen Genotyps.

	Homozygote	Heterozygote	Autochthone	Allochthone und Hybriden
Anteil beobachtet	0,44	0,56	0,50	0,50
Anteil erwartet	0,54	0,46	0,54	0,46
p-Wert	0,41		0,72	

Der amphibienspezifische Erreger wurde darüber hinaus bei verendeten *Triturus alpestris* (Bergmolch) aus der Schweiz nachgewiesen, was zeigt, dass *B. dendrobatidis* dort zum Keimspektrum von Amphibien gehört.

Die Sequenzen der PCR-Produkte aus den Nachweistests (ITS1) waren bis auf eine Ausnahme mit einer veröffentlichten Sequenz identisch (BOYLE et al. 2004, NCBI Accession AY598034). Der abweichende *B. dendrobatidis*-Genotyp wurde bei einer *R. ridibunda* aus dem Rhein bei Offenburg gefunden. Die ermittelte Sequenzdivergenz von 3 % zeigt, dass es mehrere *B. dendrobatidis*-Stämme gibt, wobei unklar bleibt, ob sich diese in ihrer Virulenz unterscheiden.

An keinem der untersuchten Gewässer konnten verendete Tiere gefunden werden.

4 DISKUSSION

4.1 Sammlung der Proben

Es war ein Ziel dieser Arbeit, die Verbreitung allochthoner Wasserfrösche in Deutschland möglichst großflächig zu erfassen. Die ausgewählten Populationen liegen daher zum einen in Regionen, in denen Aussetzungen bekannt geworden sind, wie dem Ruhrtal (SCHRÖER 1997, KORDGES 1988) und dem südwestdeutschen Raum, der wahrscheinlich durch die Ausbreitung allochthoner Frösche aus der Schweiz beeinflusst wird (GROSSENBACHER 1988). Zum anderen wurden bis zum Niederrhein und der Mosel Proben gewonnen. Die Populationen liegen überwiegend in der Nähe großer Flüsse (Rhein, Mosel, Ruhr), da angenommen wird, dass diese als Ausbreitungsschienen dienen, entlang derer die Wahrscheinlichkeit für den Nachweis eingeschleppter Formen am größten ist und gleichzeitig das genetische Spektrum endemischer Formen mit erfasst wird. Der Nachweis genetischer Merkmale (mt-DNA) von *R. bergeri* im Raum um Karlsruhe, deren Verbreitung in Deutschland nicht bekannt war, motivierte zudem, das Untersuchungsgebiet weiter auszudehnen.

Bedingt durch die unterschiedlichen Habitatstrukturen und Populationsdichten sind die erhaltenen Stichprobengrößen von den Fundorten verschieden. Da die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Genotyp zu erfassen, mit der Stichprobengröße ansteigt und es besonders auf die Erfassung möglichst vieler, auch seltener Allele ankam, stammt die Mehrzahl der Proben von leichter, und damit in größerer Stückzahl zu fangenden, juvenilen Wasserfröschen. Ein weiterer Vorteil, den die Beprobung juveniler Tiere hat, liegt darin, dass so vor allem diejenigen Genotypen erfasst werden, die in den Populationen erfolgreich reproduzieren und aller Wahrscheinlichkeit nach auch zukünftig fertile Nachkommen hervorbringen.

Allerdings ist die Zuverlässigkeit bei der Bestimmung des Phänotyps juveniler Wasserfrösche stark eingeschränkt. Bei adulten Tieren der heimischen Wasserfroschformen, *R. ridibunda*, *R. lessonae* und *R. kl. esculenta* konnte SCHRÖER (1997) auf der Grundlage von fünf Habitusmerkmalen den tatsächlichen Genotyp bei 86 % der untersuchten Tiere erfolgreich bestimmen. Es ist zu erwarten, dass diese Quote bei überwiegend juvenilen Tieren unter feldbiologischen Bedingungen deutlich geringer ausfällt. Der Phänotyp wurde deshalb nur in wenigen eindeutigen Fällen erfasst, in der Auswertung jedoch nicht berücksichtigt. Zuverlässigere Bestimmungen wurden durch die genetischen Untersuchungen erwartet.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit vermutet lassen, dass viele ausgesetzte *R. ridibunda* aus den nördlich an Griechenland grenzenden Staaten, einschließlich Rumänien und Ungarn, stammen, wären weitergehende Aussagen möglich gewesen, wenn mehr Proben aus diesen Ländern zur Verfügung gestanden hätten. Dennoch konnte an Hand der großen Zahl von Vergleichsproben, mit Schwerpunkten in Frankreich und der Türkei, die überwiegende Zahl der genetischen Merkmale als ihrem Ursprung nach autochthon oder allochthon zugeordnet werden.

4.2 Genetische Marker

Zur Bestimmung der nukleären Genotypen wurde am Beginn der Arbeit das Exon 1 des Tyrosinase-Gens herangezogen (MIURA et al. 1995). Im Vergleich verschiedener Genotypen erwies sich dieses Fragment des Tyrosinase-Gens als sehr konserviert. Dennoch konnten Substitutionen gefunden werden, an Hand derer Wasserfroschformen auch innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe unterschieden werden können. Anders als erwartet wurden aber zwischen Wasserfröschen aus heimischen Populationen keine für Typisierungen geeignete Substitutionen gefunden. Ebenso konnten keine für *R. lessonae* bzw. *R. ridibunda* typischen Genotypen unterschieden werden. Die Ursachen dafür sind noch nicht geklärt, könnten aber in einer Angleichung der Tyrosinase-Gensequenzen durch Rekombinationsereignisse liegen. Als weiterer Kernmarker wurde daher die ITS2-Region ausgewählt.

4.2.1 ITS2-Region

Es war nicht möglich, ein Gesamtalignment aller identifizierten ITS2-Allele der westpaläarktischen Wasserfrösche zu erstellen. Zwischen phylogenetisch weit entfernten Taxa konnten in einzelnen Abschnitten der ITS2-Region, hauptsächlich bedingt durch die große Zahl von Indels, nicht genügend homologe Positionen erkannt werden. So konnten die Sequenzdaten von *R. perezi* nicht mit den ITS2-Allelen von *R. ridibunda* und *R. lessonae* verglichen werden. Darüber hinaus waren die erhaltenen Sequenzen von mehreren Wasserfroschformen zwischen 100 und 140 Bp gegenüber Vertretern der *R. ridibunda*-Gruppe verkürzt, wobei dies auch bei einigen Allelen der *R. ridibunda*-Gruppe selbst auftrat. Bei der häufig für phylogenetische und diagnostische Untersuchungen verwendeten ITS2-Region wurden ausgeprägte Längenunterschiede sowohl bei interspezifischen Vergleichen entfernt verwandter Tiergruppen (z. B. umfasst die ITS2-Region von *Acropora* (Korallen) ca. 100 Bp (ODORICO & MILLER 1997) bei Ixodidae (Zecken) dagegen 1547 Bp (HLINKA et al. 2002), als auch beim Vergleich eng verwandter *Xenopus*- und *Mus*-Arten (z. B. MICHOT et al. 1999, SUMIDA et al. 2004) festgestellt.

Die hier erhaltenen, unterschiedlich langen Sequenzen der ITS2-Region gehen aber sehr wahrscheinlich nicht auf Längenpolymorphismen zurück, sondern haben ihre Ursache vermutlich in Sekundärstrukturen, deren Stabilität und/oder Struktur allelspezifisch variiert, da die PCR-Produkte keine unterschiedlichen Fragmentlängen erkennen ließen. Die Sequenz der gesamten ITS2-Region konnte nur für eine *R. lessonae* und *R. nigromaculata* erhalten werden. Trotz umfangreicher Versuche gelang es nicht, dieses Ergebnis zu wiederholen. Die Berechnung von Sekundärstrukturen der ITS2-Region blieb deshalb auf je ein Allel der genannten Taxa beschränkt, und es konnten keine Arten übergreifenden Strukturvergleiche durchgeführt werden.

Die erheblichen Schwierigkeiten bei der Sequenzierung der ITS2-Region scheinen ein seltenes, bei westpaläarktischen Wasserfröschen besonders ausgeprägtes Problem zu sein. Unter der großen Zahl molekulargenetischer Untersuchungen, bei denen die ITS2-Region als Marker genutzt wurde (siehe Referenzen dieses Abschnitts), sind keine Berichte von massiven Problemen

enthalten. Häufig genügte der Zusatz von DMSO oder Betain, um die komplette Zielsequenz in den PCR's amplifizieren zu können (z. B. WALTON et al. 1999). Die Sequenzierungen der zumeist klonierten PCR-Produkte gelang darauf hin ohne Einschränkungen. Nur im Falle des Pilzes *Batrachochytrium dendrobatidis*, welcher mit molekularen Methoden auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, traten durch Haarnadelstrukturen verursachte Sequenzierprobleme innerhalb der ITS1-Regionen auf (BOYLE et al. 2004).

Wie auch für andere Vertebraten gefunden, zeichnet sich die ITS2-Region bei Wasserfröschen durch einen sehr hohen GC-Gehalt aus (Tab. 13), welcher wiederum die Stabilität der Sekundärstrukturen erhöht. Die Werte liegen im Mittel bei 78,0 %.

Tab. 13: GC-Gehalt der ITS2-Region bei verschiedenen Wirbeltieren.

Art	GC-Gehalt [%]	Referenz	Nummer (EMBL-Sequenzdatenbank)
<i>Rana</i> spp. (westpaläarktische Wasserfrösche)	75,5 - 81,1	diese Arbeit	
<i>Xenopus borealis</i>	81,8	FURLONG & MADEN 1983	M36008
<i>Xenopus laevis</i>	88,2	FURLONG & MADEN 1983	
<i>Rana nigromaculata</i>	82,2	SUMIDA et al. 2004	AB099628
<i>Mus musculus</i>	74,6	GROZDANOV et al. 2003	BK000964
<i>Auxis rochei</i> (Fregattmakrele)	72,2	CATANESE et al. unveröff.	AB193568
<i>Gallus gallus</i>	67,6	TANG et al. unveröff.	DQ018755
<i>Lacerta agilis</i>	77,6	VORONOV et al. 2006	DQ343130
Mensch	83,0	GONZALES & SYLVESTER 1995	X17626

Bei Untersuchungen der ITS2-Region ist zu beachten, dass dieser Marker innerhalb der ribosomalen Transkriptionseinheit in hunderten von Kopien im Genom vorliegt (LI 1997). Obwohl die unterschiedlichen Kopien unabhängig voneinander Mutationen akkumulieren können, sind ihre Sequenzen dennoch zumeist identisch. Die Ursache hierfür wird in genetischen Mechanismen gesehen (die als *molecular drive* bezeichnet werden; DOVER 1982), welche eine *concerted evolution* (konzertierte, gemeinsame Evolution) von multigen Familien bewirken (also auch der ribosomalen Transkriptionseinheiten) und zu einer Angleichung der Tandem Repeat-Sequenzen im Genomen führen. Innerhalb panmiktischer Populationen führen diese Evolutionsmechanismen zum stetigen Angleich von multigen Familien auch zwischen Individuen (DOVER 1986), was wesentlich dazu beiträgt, dass trotz der hohen Variabilität der ITS2-Region die intraspezifische Variabilität geringer ist als die interspezifische (OTHA & DOVER 1984). Homogenisierungen durch *concerted evolution* wirken zwischen verschiedenen Genomregionen (Schwesterchromatiden, homologe und nicht homologe Chromosomen) unterschiedlich schnell (DOVER 1989), wobei die Mechanismen sogar bei verschiedenen Teilen der ribosomalen Transkriptionseinheit variieren können (POLANCO et al. 1998).

Bei einer Reihe von Organismen konnten allerdings intraindividuelle Differenzen zwischen den Kopien der ITS2-Region nachgewiesen werden (z. B. Cambaridae -Neuweltliche Flusskrebse-, Anopheles-Mücke und *Aeschyanthus* -Schamblume-; HARRIS & CRANDALL 2000; ONYABE & CONN 1999, DENDUANGBORIPANT & CRONK 2000). Für diese Untersuchungen wurden die Klone von PCR-Produkten der ITS-Regionen sequenziert und verglichen. Da die Zahl der sequenzierten Klone von jedem Individuum (zwischen 2 und 10) häufig der Zahl unterschiedlicher ITS-Varianten der Individuen entsprach und diese sich meist nur an ein oder zwei Positionen voneinander unterschieden, kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der Variabilität auf Fehler der Polymerase zurückgeht, die bei der Amplifikation der ITS-Regionen auftreten.

Auch bei der Klonierung von PCR-Produkten heterozygoter Wasserfrösche konnten vereinzelt solche Fehler der Polymerase festgestellt werden. Der erwartete Anteil von PCR-Produkten, die Transkriptionsfehler enthalten, errechnet sich nach SMITH & MODRICH (1997) aus:

$$f = 2 \times (\text{Länge des PCR-Produkts}) \times (\text{Anzahl der Zyklen}) \times (\text{Fehlerrate der Polymerase})$$
$$f = 2 \times 330\text{Bp} \times 45 \times 10^{-5} = 0,30$$

Bei der verwendeten Taq-Polymerase können demnach in ca. 30 % aller ITS2-PCR-Produkte Fehler erwartet werden. Die hohe Zahl von monomeren G- und C-Folgen dürfte die Fehleranfälligkeit der Polymerase weiter erhöht haben (CLARKE et al. 2001). Die Fehlerstellen innerhalb der klonierten PCR-Produkte konnten durch Vergleiche mit den jeweiligen Sequenzen (Konsensussequenzen) erkannt werden, die durch Direktsequenzierung der PCR-Produkte der Gesamt DNA-Proben erhalten wurden. Da die Fehler der Polymerase weitestgehend zufällig über die Länge des PCR-Fragments verteilt sind, enthält die überwiegende Mehrzahl aller Fragmente, bezogen auf die einzelnen Positionen, die korrekten Nukleotide. Dadurch wird bei der Sequenzierung die korrekte Zielsequenz (Konsensussequenz) der zum Teil fehlerhaften Fragmente sichtbar.

In ca. 44 % aller klonierten ITS2 PCR-Produkte wurde wenigstens eine Position festgestellt, die wahrscheinlich auf einen Fehler der Polymerase zurückgeht. Wird ein Schwankungsbereich für die Fehlerrate der Polymerase angenommen, beeinflusst auch durch Charakteristika der amplifizierten Sequenz, können die Fehlerstellen bei den klonierten PCR-Fragmenten durch die erwartete Fehlerhäufigkeit der Polymerase erklärt werden. Dennoch ist es möglich, dass Sequenzsignale von ITS2-Varianten mit geringen Anteilen im Genom eines Individuums in den PCR-Konsensussequenzen nicht erkennbar waren. Falls seltene ITS2-Varianten mittels Klonierung gefunden wurden, so waren diese nicht von Fehlern der Polymerase zu unterscheiden.

Zwei weitere Aspekte sprechen allerdings dafür, dass es sich bei den Abweichungen der klonierten PCR-Fragmente überwiegend um Fehler der Polymerase handelt. Zum einen wurde zusammen mit der ITS2-Region auch ein Teil der hochkonservierten 28S rDNA sequenziert. Innerhalb des 28S rDNA-Abschnitts wurden keine Sequenzunterschiede zwischen Vertretern des Wasserfroschkomplexes festgestellt. Entsprechend der Länge dieses Abschnitts traten dagegen

bei den klonierten PCR-Fragmenten Unterschiede zu den Sequenzen auf, die an Hand der Gesamt DNA-Proben erhalten wurden. Weiterhin weichen die durch Klonierung erkannten ITS2-Varianten in 85,7 % der Fälle in einer Position, die restlichen in zwei Positionen von der Konsensussequenz ab. Sollten ITS2-Varianten mit sehr geringen Anteilen unter den Tandem Repeats zu finden sein, wären bei einzelnen Klonen auch größere Sequenzunterschiede zu erwarten gewesen. Demnach konnten keine Anhaltspunkte für intraindividuell unterschiedliche ITS2-Varianten gefunden werden, welche nicht durch Direktsequenzierungen der Gesamt DNA-Proben als Heterozygoten erkennbar waren.

Der hohe Anteil heterozygoter Individuen (49,1 %), bei denen zum Teil ITS2-Allele unterschiedlicher Spezies auftraten, kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass schwerpunktmäßig Populationen beprobt wurden, die, bedingt durch das Vorkommen allochthoner Wasserfrösche, eine hohe Vielfalt genetischer Linien aufwiesen. Die nur gering ausgeprägten interspezifischen Kreuzungsbarrieren zwischen vielen Wasserfroscharten begünstigen ebenfalls die Bildung heterozygoter Individuen (PLÖTNER 1998, 2005).

4.2.2 Mitochondriales ND3-Gen

Für die bearbeitete Fragestellung war die Auswahl der untersuchten genetischen Marker entscheidend, da diese zum einen die Unterscheidung der verschiedenen Wasserfrösche (allochthon und autochthon) mit hoher Auflösung ermöglichen sollten, zum anderen aber die Homologisierbarkeit der Sequenzdaten aller Formen erreicht werden musste. Diese Anforderungen waren durch das mitochondriale ND3-Gen erfüllt. Wie schon aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt, können an Hand der Variabilität dieses Gen die phylogenetischen Beziehungen der westpaläarktischen Wasserfrösche mit hoher Auflösung rekonstruiert werden (OHST 2001, PLÖTNER & OHST 2001). Verglichen mit anderen mt-Genen, gehören die Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase zu den variabelsten Abschnitten (MEYER 1993). Verglichen mit dem ND3-Gen zeigten das Cytochrom b-Gen ca. 30 %, die 12S- und 16S rRNA-Gene sogar ca. 80 % weniger Variabilität innerhalb der untersuchten Artengruppe (SUMIDA et al. 2000, PLÖTNER 1998, LYMBERAKIS et al. 2007). Für die bearbeitete Fragestellung von vorrangiger Bedeutung ist die Unterscheidung der genetischen Merkmale autochthoner Tiere von südeuropäischen Wasserfröschen aber auch zwischen Tieren aus Griechenland und der Türkei. Die durchschnittlichen genetischen Distanzen innerhalb des ND3-Gens zwischen autochthonen und balkanischen sowie autochthonen und anatolischen Fröschen betrugen nur 1,5 bzw. 6,0 %. Diese schon innerhalb des ND3-Gens zum Teil geringen Differenzierungen verdeutlichen die Notwendigkeit, möglichst variable Marker zu untersuchen.

4.3 Genetische Differenzierungen und Verwandtschaftsanalysen

4.3.1 Vergleich der ITS2-Daten mit anderen Merkmalskomplexen

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen es, phylogenetische Hypothesen auf der Grundlage nukleärer und mitochondrialer Gene vergleichend zu analysieren. Zusätzlich stehen proteinelektrophoretische aber auch immunologische Daten zur Verfügung, die in den vergangenen Jahrzehnten häufig zur Differenzierung westpaläarktischer Wasserfrösche und zur Rekonstruktionen ihrer verwandtschaftlichen Beziehungen eingesetzt wurden (z. B. ENGELMANN 1973, UZZELL 1982, GÜNTHER & PLÖTNER 1994, BEERLI et al. 1996, SCHMELLER 1999). Diese Daten ermöglichen den Vergleich der Verwandtschaftsgrade auf der Grundlage verschiedener molekularer Merkmale. Allerdings können nur die ITS2-Sequenzdaten von vier Wasserfroscharten einbezogen werden (*R. lessonae*, *R. ridibunda*, *R. epeirotica* und *R. perezi*). Auf Grund von Unsicherheiten im Alignment müssen in den ITS2-Sequenzvergleichen mit *R. perezi* Schwankungen von ca. $\pm 2\%$ in den p-Distanzen angenommen werden. Die Distanzwerte aus proteinelektrophoretischen-, immunologischen- und ITS2-Sequenzdaten können nicht direkt, sondern ausschließlich relativ miteinander verglichen werden. Die möglichen Vergleiche sind in Abb. 31 dargestellt. Daraus ergibt sich, dass die immunologischen Distanzen mit den Divergenzen der ITS2-Sequenzen, in den drei möglichen Vergleichen, gut korrelieren ($r=0,96$). Die von BEERLI et al. (1996) mittels proteinelektrophoretischer Daten bestimmten Distanzen korrelieren dagegen deutlich schwächer mit den ITS2-Sequenzdaten ($r=0,82$). Große Unterschiede treten vor allem in paarweisen Vergleichen von *R. perezi* mit anderen Taxa auf, wobei die Distanzen nach BEERLI et al. (1996) vergleichsweise gering ausfallen. In anderen paarweisen Vergleichen mit hohen Gesamtdistanzen zeigen sich bessere Übereinstimmungen (rid / les; rid / epe; les / epe). Bei geringeren Distanzen hingegen, wie sie sich für Genotypen aus bestimmten Populationen ergeben, zeigten sich erneut große Unterschiede. Der Vergleich der von GÜNTHER & PLÖTNER (1994) ermittelten Distanzwerte von Alloenzymen aus verschiedenen Wasserfroschpopulationen mit den ITS2-Sequenzdaten ergibt eine starke Korrelation der Wertepaare ($r=0,95$).

Die Messwerte verschiedener Merkmalskomplexe können sich möglicherweise auch durch Sättigungseffekte (bei mehr oder weniger variablen Merkmalen) und Streuungen (durch geringe Anzahl quantifizierbarer Differenzen) unterscheiden. Da außerdem auch nicht dieselben Tiere untersucht wurden, kann keine völlige Übereinstimmung der ITS2-Sequenzdivergenzen, mit den bei anderen Merkmalskomplexen gefundenen Distanzen erwartet werden. Es zeigt sich aber, dass es sich bei der ITS2-Region um einen aussagekräftigern Marker handelt, auf dessen Grundlage ähnliche Ergebnisse im Vergleich zu bisherigen Erkenntnissen folgern. Stammbaumrekonstruktionen auf Basis der ITS2-Allele entsprechen weitgehend den phylogenetischen Hypothesen, die an Hand mitochondrialer DNA-Sequenzen und proteinelektrophoretischer Daten erstellt wurden (z. B. HOTZ & UZZELL 1982, BEERLI et al. 1996, PLÖTNER 1998, OHST 2001, LYMBERAKIS et al. 2007).

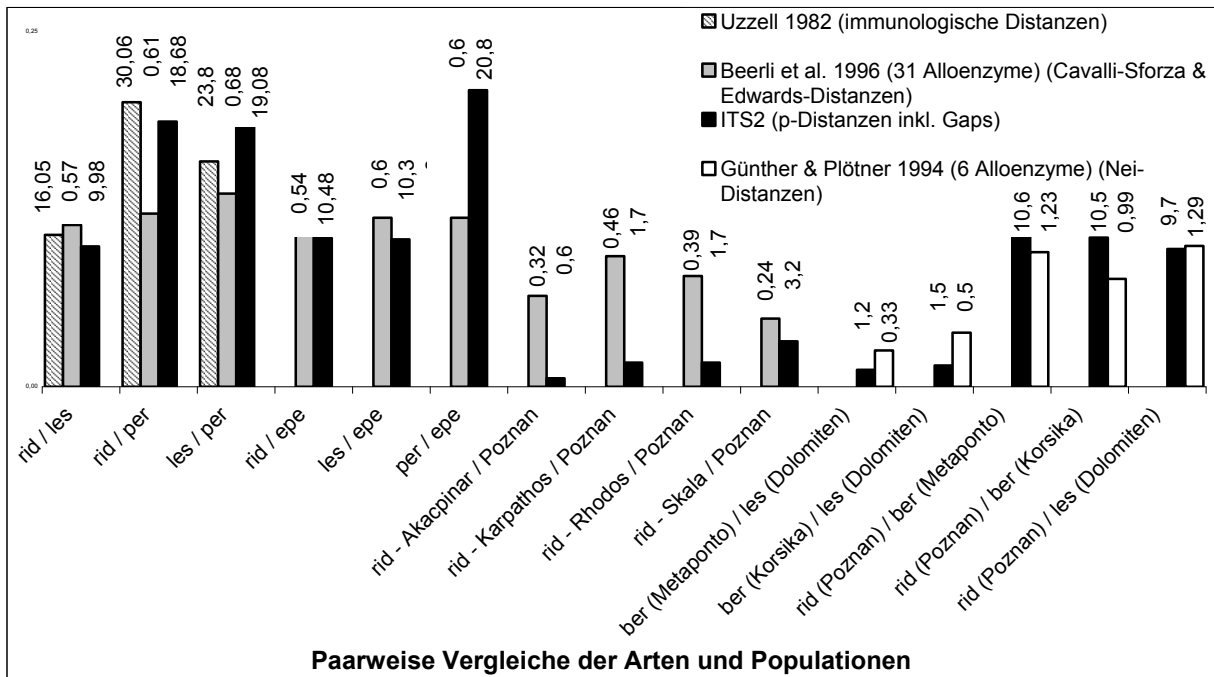


Abb. 31: ITS2-Sequenzdivergenzen im Vergleich zu immunologischen und proteinelektrophoretischen Untersuchungen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Datenreihen unterschiedlich skaliert. rid - *R. ridibunda*, les - *R. lessonae*, epe - *R. epeirotica*, ber - *R. bergeri*. Fundortnummern: Akcapinar-101, Poznan-81, Karpathos-114, Rhodos-117, Skala-124, Dolomiten-130, Metaponto-183, Korsika-134.

In den Stammbaumrekonstruktionen auf Grundlage der ITS2-Sequenzen konnten mit der *R. ridibunda*-Gruppe, der *R. lessonae*-Gruppe und *R. epeirotica*, drei Verwandtschaftsgruppen deutlich voneinander abgegrenzt werden (Abb. 16 und 17). Zwar konnten die ITS2-Sequenzen von *R. perezi* nicht in die Stammbaumberechnungen einbezogen werden, jedoch weisen die großen Divergenzen (ca. 20 % p-Distanz) zu den anderen Taxa (*R. ridibunda*, *R. bedriagae*, *R. lessonae* und *R. epeirotica*), die untereinander maximal 13,1 % erreichen, auf eine basale Abspaltung während der Phylogenie westpaläarktischer Wasserfrösche hin.

4.3.2 *R. ridibunda*-Gruppe

Die hohe Variabilität der ITS2-Region ermöglichte die Differenzierung von 33 Allelen innerhalb der *R. ridibunda*-Gruppe, welche wahrscheinlich auch Allele von *R. bedriagae* (RC9 und RC10) umfasst. Die ITS2-Daten bestätigen damit die in früheren Untersuchungen auf Basis von mt-DNA Daten gefundenen geringen genetischen Differenzen zwischen *R. ridibunda* und *R. bedriagae* (Abb. 18 und 19 sowie PLÖTNER et al. 2001, OHST 2001, PLÖTNER 1998). Insgesamt wurden aber zu wenige Tiere aus dem Nahen Osten untersucht, um die genetischen Differenzen von *R. bedriagae* gegenüber *R. cf. ridibunda* aus Anatolien und *R. ridibunda* aus Mittel- und Südeuropa genauer spezifizieren zu können.

Die in Griechenland typischen ITS2-Allele (RC11, RC12, RC18) unterscheiden sich gegenüber anderen Allelen der *R. ridibunda*-Gruppe durch 3-4 Substitutionen. Auch den Daten

mitochondrialer Gene zu Folge, bilden die mt-Genotypen griechischer Frösche eine geschlossenen Abstammungsgemeinschaft, die mit den mitteleuropäischen Linien eng verwandt ist (OHST 2001, LYMBERAKIS et al. 2007). Unter den mt-Genotypen, die auf dem südlichen Balkan vorkommen, ist ausschließlich *rid-10b* autochthon in Zentraleuropa verbreitet. Damit scheint der Genfluss zwischen den Populationen im Süden Griechenlands und Formen der *R. ridibunda*-Gruppe in anderen Lebensräumen weitgehend eingeschränkt.

Die ITS2-Allele anatolischer Tiere weisen eine hohe Diversität auf. Einige Varianten sind dabei eng verwandt mit Allelen von Vertretern der *R. ridibunda*-Gruppe aus Zentraleuropa und Mittelasien. Dadurch war in einigen Fällen keine klare Abgrenzung allochthoner Formen aus Anatolien gegenüber heimischen *R. ridibunda* möglich. Dieser Befund ist vor allem deswegen überraschend, da die mt-Genotypen anatolischer Tiere immer von denen einheimischer sowie balkanischer *R. ridibunda* unterschieden werden konnten. Den mt-Sequenzdaten zu Folge weisen die balkanischen (griechischen) *R. ridibunda* die größte Ähnlichkeit zu mitteleuropäischen Seefröschen auf, wohingegen die ITS2-Sequenzen auf eine engere Verwandtschaft heimischer mit einigen anatolischen Wasserfroschformen hindeuten. Dieser Widerspruch ließe sich nur durch die Analyse weiterer Kernmarker auflösen. Möglicherweise sind aber auch Gen-Introgressionen bzw. teilweise genetische Durchmischungen zwischen Populationen in glazialen Refugialgebieten (Bosporusregion?) für die widersprüchliche Merkmalsverteilung verantwortlich.

4.3.3 *R. lessonae*-Gruppe

Die in den Stammbaumrekonstruktionen als *R. lessonae*-Gruppe zusammengefassten Allele umfassen wahrscheinlich ebenfalls die für *R. bergeri* typischen Varianten, da auch Tiere aus dem Verbreitungsgebiet des Italienischen Wasserfrosches untersucht wurden. Die von Korsika und Sizilien stammenden Proben weisen sowohl untereinander als auch zu Populationen vom Festland klare Unterschiede auf (*L8*, *L9*, *L10*). Diese Differenzierungen zeichnen sich auch an Hand von proteinelektrophoretischen-, mitochondrialen und nukleären Daten ab (Abb. 18, SANTUCCI et al. 1996, PLÖTNER 2005, PLÖTNER unveröff.). Die Divergenzen unter den ITS2-Sequenzen sprechen allerdings nicht dafür, die Inselpopulationen als separate Arten anzusehen.

Die vergleichsweise geringen genetischen Differenzen zwischen *R. lessonae* und *R. bergeri* spiegeln sich sowohl in der mt-DNA als auch in der ITS2-Region wider (Abb. 16 und 18). Der entlang des Rheins bei Karlsruhe überraschend häufig gefundene für *R. bergeri* spezifische mt-Genotyp *berg-1* unterscheidet sich von dem im selben Gebiet auftretenden *R. lessonae*-spezifischen mt-Genotyp *less-1* um 2,6 % (9 Substitutionen). Unter den *R. lessonae*-spezifischen ITS2-Allelen stimmt lediglich die Verbreitung der Variante *L3* mit der des *R. bergeri* mt-Genotyps (*berg-1*) überein. Die Divergenzen zwischen *L3* und den autochthonen *R. lessonae*-Allelen (*L1*, *L2*) scheinen allerdings mit 0,75-1,1 % (2-3 Substitutionen) im Vergleich zur Diversität der *R. lessonae*-Gruppe insgesamt kaum die Differenzierung zweier Arten widerzuspiegeln. Durch die freie Kreuzbarkeit von *R. bergeri* und *R. lessonae* (BERGER et al. 1994, GÜNTHER & PLÖTNER 1994) sowie deren syntope Vorkommen in Norditalien (BALLETO et al. 1986, GÜNTHER 1997) können

rekombinante Allele entstehen, die sich dann in den Populationen von *R. bergeri* und *R. kl. hispanica* ausbreiten.

Die verkürzte Sequenz einer *R. shqiperica* konnte nicht in das Alignment einbezogen werden, obwohl diese Art enge verwandtschaftliche Beziehungen zur *R. lessonae*-Gruppe aufweist. Bei diesem Individuum, dass sowohl phänotypisch als auch auf Grundlage der mt-Daten als *R. shqiperica* einzustufen ist, wurde ein ITS2-Allel bestimmt, das große Ähnlichkeit zu dem nur in Süddeutschland gefundenen *R. ridibunda* Allel RG2 zeigt (Probe 717). Dieser Befund könnte auf Rekombinationen, ermöglicht durch Hybridisierungen zwischen *R. shqiperica* und *R. ridibunda* zurückzuführen sein, die schon mehrfach beschrieben wurden (GÜNTER 1982, SCHNEIDER & JOERMANN 1988, BERGER et al. 1994).

4.4 Allochthone Formen in der heimischen Wasserfroschfauna

Die Möglichkeit, allochthone von autochthonen Wasserfröschen unterscheiden zu können, hängt sowohl von den untersuchten Merkmalen, als auch von der Herkunft eingeschleppter Tiere ab. Diese Zusammenhänge können sehr gut am Beispiel der Schweiz dargestellt werden. Unter den schweizer Proben wurden sowohl genetische Merkmale autochthoner als auch allochthoner Wasserfrösche (bezogen auf Mitteleuropa) nachgewiesen. Da aber bekannt ist, dass in der Schweiz alle Seefroschpopulationen auf Aussetzungen zurückgehen (GROSSENBACHER 1988), wird klar, dass ein Teil der eingeschleppten Tiere auch aus Gebieten stammen muss, in denen Wasserfrösche vorkommen, welche an Hand der gewählten Marker nicht von autochthonen Formen unterschieden werden können. Vermutlich handelt es sich bei vielen schweizer Seefröschen um Individuen, die aus Ungarn und dem nördlichen Balkan stammen (WITTENBERG 2005, GROSSENBACHER pers. Mitteilung). Analog dazu könnte der Anteil der tatsächlich in Deutschland eingeschleppten Tiere unterschätzt werden, wenn deren Ursprungsgebiete innerhalb der Verbreitungsgrenzen der in Zentraleuropa autochthonen Varianten von ND3 und ITS2 liegen.

4.4.1 Geographischer Ursprung autochthoner *R. ridibunda*

In der westlichen Paläarktis wird die höchste genetische Diversität unter Wasserfröschen in einem West-Ost Transsekt entlang der nördlichen Mittelmeerküste und in Anatolien erreicht (OHST 2001, PLÖTNER 2005, LYMBERAKIS et al. 2007). In diesem Korridor liegen vermutlich die glazialen Refugialgebiete der europäischen Wasserfrösche, z. B. auf der iberischen Halbinsel, in Süditalien, auf dem südlichen Balkan und in Anatolien (ZEISSET & BEEBEE 2001, VEITH et al. 2003, SNELL et al. 2005). Gebirge und Meeresarme trennen die Areale der Wasserfroschformen und begünstigen so die Diversifikation. Es zeigt sich eine räumliche Gliederung in Zentren mit hoher genetischer Diversität in südlichen Arealen und nur wenigen genetischen Varianten im Norden (vgl. Abb. 1 und 2), wie dies vergleichbar z. B. auch bei der europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) gefunden wurde (FRITZ 1996, LENK et al. 1999).

Die postglaziale Ausbreitung der europäischen Wasserfrösche scheint von den östlichen Rückzugsgebieten früher oder schneller erfolgt zu sein als von Südwesteuropa aus. Dies kommt in der Verbreitung genetischer Merkmale zentraleuropäischer *R. ridibunda* zum Ausdruck, die ihre südlichsten Vorkommen auf dem östlichen Balkan erreichen. Auch *R. lessonae*, deren Refugialgebiet vermutlich auf dem Balkan oder in Norditalien lag, breitete sich von dort über Ost- und Zentraleuropa bis zur französischen Atlantikküste, Südengland und Skandinavien aus (ZEISSET & BEEBEE 2001, SNELL et al. 2005). Dagegen erreichte *R. perezi*, von der iberischen Halbinsel aus, lediglich den Süden Frankreichs. Ähnliche postglaziale Ausbreitungsmuster konnten auch für andere Tierarten belegt werden, z. B. für den Kammolch (*Triturus cristatus*), die Sumpfschildkröte und den Grasshüpfer (*Chorthippus parallelus*) (FRITZ 1996, HEWITT 1996, TABERLET et al. 1998).

Mitochondriale Sequenzdaten als auch die Verbreitung der ITS2-Allele legen ein Szenario für die postglaziale Wiederbesiedlung Zentraleuropas durch *R. ridibunda* nahe, das vom östlichen Griechenland oder West-Anatolien nordwärts, entlang des östlichen Balkan ausgeht. So sind die südlichsten Vorkommen des autochthonen mt-Genotyps *rid-1* aus dem europäischen Teil der Türkei bekannt. Ebenso erstrecken sich die Vorkommen des autochthonen ITS2-Allels *R2* entlang der westlichen Schwarzmeerküste bis in den europäischen Teil der Türkei. Mit geringer Häufigkeit konnte das Allel *R2* auch im zentralen und südlichen Anatolien nachgewiesen werden (Abb. 20; möglicherweise auch verschleppt innerhalb der Türkei).

Obwohl sich die Verbreitungsgebiete von *R2* und *rid-1* als autochthone genetische Merkmale in großen Teilen decken, wird eine Kopplung der beiden Marker durch die rekonstruierten Verwandtschaftsverhältnisse nicht direkt unterstützt. Die ITS2-Allele *R1* und *R2* weisen nur geringe genetischen Distanzen zu anatolischen ITS2-Allelen auf (0,4 - 1,5 %; zu balkanischen 2,6 - 3,7 %), wogegen der mt-Genotyp *rid-1* eine deutlich engere Verwandtschaft zu griechischen mt-Genotypen zeigt (0,6 - 1,8 %; zu anatolischen 5,3 - 7,1 %). Dieser Widerspruch könnte durch genetische Introgressionen, die vor der postglazialen Expansion des Areals der autochthonen *R. ridibunda* auftraten, erklärt werden.

Neben den ITS2-Allelen *R1* und *R2*, deren autochthoner Ursprung gut begründet werden kann, tritt auch das Allel *R3* sehr häufig unter den *R. ridibunda*-typischen Allelen in Deutschland auf (56-mal, 15,1 %, Abb. 25). Das vergleichsweise kleine Gebiet, in dem dieses Allel in Deutschland gefunden wurde, lässt Zweifel an seinem autochthonen Status aufkommen. Das Allel *R3* könnte sich, seit einer möglichen Einschleppung durch allochthone Tiere, in den angrenzenden Populationen ausgebreitet haben. Möglich wäre aber auch, dass nördlich Karlsruhe Relikte einer einstmals großflächigeren Verbreitung auftreten. Zu beachten wären auch Wechselwirkungen mit anderen, speziell dort auftretenden, genetischen Faktoren. Hinweise darauf ergeben sich durch das ausschließlich heterozygote Auftreten (signifikante Abweichung vom HWG, Abb. 26) und die häufige Kopplung mit dem mt-Genotyp *berg-1*, welcher in derselben Region fast ausschließlich auftritt. Als einziges *R. ridibunda*-Allel tritt *R3* zusammen mit dem mt-Genotyp *berg-1* auf. Umgekehrt gibt es aber auch Nachweise des Allels *R3* zusammen mit *R. ridibunda*-spezifischen

mt-Genotypen. Der Ursprung des Allels *R3* kann letztendlich nicht geklärt werden. Die Besonderheit, dass diese Allel nicht homozygot auftritt, spricht für einen erheblichen Selektionsnachteil, der entweder durch andere Faktoren kompensiert wird oder zu einer langfristigen Reduzierung der Allelfrequenz von *R3* in den Populationen führt. Als Ursache für das Fehlen von homozygoten *R3/R3*-Individuen kommt die Kopplung mit einem Letalfaktor in Frage. Auch bei homotypischen *R. kl. esculenta* Kreuzungen (*E* x *E*), aus denen häufig gar keine lebensfähigen Nachkommen hervorgehen oder diese nur eine geringe Vitalität und ausgeprägte Fertilitätsmängel aufweisen (GÜNTHER 1973, BERGER 1967), wird die Akkumulierung von Letalmutationen auf den klonal vererbten Genomen als Ursache angesehen (GRAF & POLLS PELAZ 1989, HOTZ et al. 2001). Trotzdem gibt es auch zwischen den hemiklonal vererbten *R*-Genomen Kombinationen, die bei homotypischen Paarungen von *R. kl. esculenta* lebensfähige Nachkommen hervorbringen (z. B. VORBURGER 2001, VORBURGER & REYER 2003). Obwohl erwartet werden kann, dass eine Kopplung des Allels *R3* mit möglichen Letalfaktoren durch Rekombinationen mit anderen Genomen aufgelöst werden kann, wurde im gesamten Datensatz (*n*=67) das *R3*-Allel ohne Ausnahme stets heterozygot nachgewiesen. Dies deutet auf eine klonale Vererbung des mit dem *R3*-Allel gekoppelten Genoms hin.

4.4.2 Ursprünge allochthoner Wasserfrösche in Deutschland

R. ridibunda-ähnlichen Formen wurden vor allem deshalb untersucht, da diese vergleichsweise große Froschart unter anderem zu kulinarischen Zwecken häufig verschleppt wurde, wie die Beispiele aus Frankreich und der Schweiz zeigen (GROSSENBACHER 1988, PAGANO et al. 2001, 2003). Zur Erkennung allochthoner Wasserfrösche wurden die phylogenetischen Beziehungen, geographischen Verteilungen sowie relativen Häufigkeiten genetischer Merkmale betrachtet. Daraus folgend sind umfassende Aussagen vor allem über in Deutschland vorkommende Seefrösche möglich.

Zusätzlich zu den drei häufigsten *R. ridibunda*-spezifischen ITS2-Allelen, *R1*, *R2* und *R3*, konnten noch zehn weitere Allele identifiziert werden (Tab. 7). Die mit *R4-R9* bezeichneten Allele stehen in enger Verwandtschaft zu den drei ersten, wurden aber mit insgesamt weitaus geringerer Häufigkeit (zwischen 2 und 13 Allelen) in jeweils nur wenigen Populationen nachgewiesen. Es ist daher zu vermuten, dass diese Allele mit eingeschleppten Wasserfröschen in die heimischen Populationen gelangten. Die demgegenüber geographisch großflächige Verteilung der Allele *R1* und *R2* (sowie einiger *R. lessonae*-ähnlicher Allele) zeigt, dass trotz der hohen Variabilität der ITS2-Region, gleiche Genotypen in Zentral- und Nordeuropa über große Distanzen hinweg erwartet werden können. Die hohe Diversität in einigen, vor allem süddeutschen Populationen und dem Ruhrtal, stellt also unter den Populationen in Mitteleuropa eine Besonderheit dar, die am wahrscheinlichsten durch den Einfluss allochthoner Tiere erklärt werden kann. Die genauen Ursprungsgebiete der Allele *R4-R9*, die in Anatolien oder dem nördlichen Balkan vermutet werden, konnten auf Grund der schwach ausgeprägten Differenzierungen zu anatolischen Formen und der geringen Probenzahl vom nördlichen Balkan nicht eindeutig bestimmt werden.

Unter den mit *RC1-RC4* bezeichneten, seltenen *R. ridibunda*-Allelen (3 bis 9 nachgewiesene Allele) zeigen *RC1* und *RC3* eine enge Verwandtschaft zu Allelen griechischer Wasserfrösche (Abb. 16 und 17), weshalb deren Ursprung in Südeuropa vermutet wird. Auf Grund ihrer phylogenetischen Position ist der Ursprung der Allele *RC2* und *RC4* nicht eindeutig, kann aber auf Grund einiger Sequenzmerkmale (fünf Synapomorphien, Tab. 6) in Anatolien vermutet werden.

Das ITS2-Allel *RG2* und das häufig in Anatolien gefundene *RG1* weisen eine Synapomorphie an einer vergleichsweise konservierten Position (255) auf, was einen möglichen Ursprung des Allels *RG2* in Anatolien anzeigt. Daneben wurden aber auch weitgehende Übereinstimmungen zu der Sequenz einer *R. shqipERICA* (aus Serbien/Montenegro) gefunden (auch an der Position 255). Nur durch die Untersuchung weiterer Proben vom nördlichen Balkan könnte festgestellt werden, ob der bei *R. shqipERICA* gefundene Sequenztyp für Serbien/Montenegro autochthon ist, da aus dem ehemaligen Jugoslawien bekannt ist, dass Wasserfrösche in großer Zahl importiert wurden (LJUBISAVLJEVIC et al. 2003).

Wesentlich klarer können die vermutlichen Ursprünge allochthoner Wasserfrösche an Hand mitochondrialer DNA-Sequenzen nachgezeichnet werden. Es konnten sechs mt-Genotypen identifiziert werden, deren natürliches Verbreitungsgebiet auf dem südlichen Balkan liegt (*rid-5b* - *rid-9b* und *rid-13b*). Weitere vier mt-Genotypen stammen ursprünglich aus Anatolien (cf. *rid-1*, 2, 3, 6). Damit zeichnen sich diese beiden Regionen im Süden Europas als Hauptursprungsgebiete allochthoner Formen in Deutschland ab. Dieser Befund kann teilweise darauf beruhen, dass die diversen genetischen Linien unter den balkanischen und anatolischen Wasserfröschen gut von autochthonen Fröschen differenziert werden können, wogegen viele mt-Genotypen von Tieren aus anderen Ursprungsgebieten (z. B. dem nördlichen Balkan, Rumänien und Ungarn) nicht von einheimischen Formen unterscheidbar waren.

Der Status des mt-Genotypen *berg-1* konnte nicht abschließend geklärt werden. Sollten weiterführende Untersuchungen zeigen, dass dieser durch ausgesetzte Frösche in einheimische Populationen gelangte, so würde auch Italien zu den Ursprungsgebieten allochthoner Wasserfrösche zählen.

4.4.3 Verbreitung allochthoner Wasserfrösche in Deutschland

Hohe Anteile allochthoner Genomvarianten konnten im Ruhrtal und am Oberrhein zwischen Basel und Karlsruhe gefunden werden. Einzelpopulationen, die erhebliche Einflüsse durch eingeschleppte Wasserfrösche zeigen, wurden in der Fischzuchtanlage Ettenheim sowie an der Mosel bei Trittenheim nachgewiesen. Auf Grund der unterschiedlichen Spektren allochthoner Genomvarianten können unabhängige Aussetzungsereignisse in den genannten Gebieten angenommen werden. So stammen die im Ruhrtal nachgewiesenen allochthonen mt-Genotypen ausschließlich vom Balkan, wobei der Anteil allochthoner mt-Genotypen unter allen Proben aus dem Ruhrtal mit 54,8 % sehr hoch ist. Zwei mt-Genotypen (*rid-5b*, *rid-9b*) konnten mit einer Ausnahme (Fischzuchtanlage Ettenheim) nur im Ruhrtal nachgewiesen werden, ebenso die ITS2-

Allele *RC2* und *RC3*. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen proteinelektrophoretischer Untersuchungen an Wasserfröschen aus dem Ruhrtal, bei denen ein für mitteleuropäische Seefrösche untypisches Allel der Laktatdehydrogenase gefunden wurde (SCHRÖER 1997). Als Ursache für das Auftreten der besonderen Enzymvariante unter den Seefröschen entlang der Ruhr wurde die Aussetzung und Ausbreitung allochthoner *R. ridibunda* angenommen, von denen viele aus Balkanstaaten stammten (KORDGES 1988, SCHRÖER 1997).

Aus dem Rheinabschnitt zwischen Basel und Karlsruhe liegen Nachweise nukleärer und mitochondrialer Merkmale sowohl balkanischer als auch anatolischer Formen vor. Unter 84 *R. ridibunda*-spezifischen mt-Genotypen aus dieser Region ließen sich 7,1 % balkanischen und 16,7 % anatolischen Ursprüngen zuordnen. Die Vielzahl der allochthonen genetischen Varianten am Hoch- und Oberrhein könnte auf die Ausbreitung ausgesetzter Wasserfrösche von der Schweiz aus, entlang des Rheins zurückgehen und/oder mit den Universitäten in Karlsruhe und Freiburg in Verbindung stehen. Die während der letzten Jahrzehnte beobachteten positiven Bestandsentwicklungen der Seefroschpopulationen in der Oberrheinebene könnten im Lichte dieser Ergebnisse, zumindest teilweise, durch Aussetzungen ermöglicht worden sein, wie dies bereits vermutet wurde (BUFO 2005, SOWIG et al. 2007). Analog zur vermehrten Etablierung von Seefroschpopulationen auf der deutschen Seite des Oberrheins wurde dies auch auf der französischen Seite (Elsass) beobachtet (BUFO 2005). Neben örtlichen Aussetzungen sowie einer Ausbreitung von der Schweiz müssen also auch Einschleppungen in den angrenzenden französischen Regionen als Quelle allochthoner Formen am Oberrhein in Betracht gezogen werden.

4.4.4 Genetische Introgressionen

In ostdeutschen Populationen wurden Seefrösche gefunden, die *R. lessonae*-spezifische ITS2-Allele aufwiesen, vor allem in den Populationen Lebus und Friedrichshagen (Fundorte 75 und 51). Dieser Befund bestätigt die schon mehrfach in Mitteleuropa nachgewiesene Introgression genetischen Materials von *R. lessonae* in den Genpool von *R. ridibunda* (SPOLSKY & UZZELL 1984, GRAF & POLLS PELAZ 1989, PLÖTNER & KLINKHARDT 1992, PLÖTNER 1998, PLÖTNER et al. 2008). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Populationsgenetik der *R. ridibunda*-Population in Niemegk (Fundort 45). In dieser ostdeutschen Population wiesen alle Seefrösche die für *R. lessonae* typischen mt-Genotypen auf. Aber anders als bei den beiden Populationen in Lebus und Friedrichshagen, konnten dort ausschließlich ITS2-Allele von *R. ridibunda* gefunden werden. Im Unterschied zu Lebus und Friedrichshagen scheint es sich in Niemegk um eine fast reine *R. ridibunda*-Population mit nur geringen Anteilen an *R. kl. esculenta* zu handeln. Die Introgression und Verbreitung *R. lessonae*-spezifischer mt-DNA im Genpool von *R. ridibunda* scheint demzufolge anders zu verlaufen, als die Introgression der nukleären ITS2-Region.

Die Introgression genetischen Materials allochthoner Tiere in den Genpool heimischer Wasserfrösche konnte in erheblichem Ausmaß belegt werden. Dies ist an Hand der Kombinationen von ITS2-Allelen mit unterschiedlichen Ursprüngen bei den untersuchten Individuen aber auch an Hand der Kombinationen allochthoner mt-Genotypen mit autochthonen ITS2-Allelen erkennbar. Unter den 420 Proben aus Deutschland (ohne Vergleichsproben) wiesen 100 Tiere (23,8 %) Kombinationen allochthoner *R. ridibunda*-spezifischer mt-Genotypen bzw. ITS2-Allele (ohne *R3*) mit autochthonen Allelen auf. Dagegen konnten nur vier Individuen (0,9 %) gefunden werden, die in allen drei untersuchten Merkmalen (ITS2-Allele und mt-Genotyp) allochthone Varianten zeigten. Diese rein allochthonen Kombinationen stellen auch bei diesen Individuen wahrscheinlich keine ursprünglichen Kombinationen eingeschleppter Tiere dar, sondern sind wahrscheinlich sekundär aus Zufallspaarungen hervorgegangen, da diese in Populationen mit besonders hohen Anteilen allochthoner Genommerkmale auftraten (Ettenheim, Ruhrtal und Trittenheim). Auch die vielfältigen Kombinationen allochthoner mt-Genotypen mit verschiedenen ITS2-Allelen zeigen, dass Einkreuzungen allochthoner Gene in den Genpool einheimischer Wasserfroschformen stattgefunden haben (Tab. 9). So tritt z. B. der mt-Genotyp *rid-9b*, welcher auf dem südlichen Balkan verbreitet ist, mit sieben verschiedenen ITS2-Allelen auf, darunter auch in Kombination mit *R. lessonae*-spezifischen ITS2-Allelen, die auf dem Balkan nicht vorkommen. Einen Hinweis für chromosomales *Crossing-over* (intrachromosomale Rekombinationen) liefert ein mittels Klonierung identifiziertes ITS2-Allel von einer *R. kl. hispanica* (Probe 744). Am 5'-Ende dieses ITS2-Allels entspricht die Sequenz einer *R. lessonae*-spezifischen Variante, ca. 25 Bp vor dem 3'-Ende des sequenzierbaren Bereiches weisen dagegen mehrere Positionen den folgenden Sequenzabschnitt als typisch für *R. ridibunda* aus (Tab. 6).

4.5 Kreuzungsexperimente

In den Ergebnissen der Kreuzungsexperimente zeigten sich zwei wichtige Aspekte für die Beurteilung der möglichen Einflüsse allochthoner Wasserfrösche. Zum einen konnte eine vergleichsweise rasche Entwicklung einiger Hybriden Individuen (allochthone x autochthone) in den frühen Entwicklungsstadien beobachtet werden (Abb. 27 und 29). Die durchschnittlich schnellere Entwicklung der Hybriden könnte auf einen höheren Grad heterozygoter Genloci zurückgeführt werden, der zu einem Heterosiseffekt bei den F1-Hybriden führte. Zweitens war die individuelle Entwicklungsgeschwindigkeit der Hybriden sehr variabel. Bei der heterotypischen Kreuzungsvariante zeigte ein Teil der im Freiland aufgezogenen Nachkommen verzögerte Individualentwicklungen, wogegen andere weiter entwickelt waren als die Larven der homotypischen Kreuzungen. Während am Ende des Beobachtungszeitraums alle Larven der homotypischen Kreuzungen mindestens das Stadium 29 erreichten, waren drei Hybridenlarven (10,7 %) weniger weit entwickelt (Anhang 3). Dagegen wurde das Stadium 31 von 13 Hybridenlarven erreicht (46,4%) aber von keinem Individuum der homotypischen Kreuzungen.

Die individuellen Abweichungen bezüglich der Entwicklungsgeschwindigkeiten waren bei den Hybriden im Vergleich zu den homotypischen Kreuzungsvarianten deutlich stärker ausgeprägt und könnten durch die zufällige Bildung besonders günstiger bzw. ungünstiger Genkombinationen bei den F1-Individuen verursacht worden sein.

Heterosiseffekte wurden schon mehrfach bei F1-Hybriden aus Kreuzungen zwischen *R. ridibunda* und *R. lessonae* beschrieben (BERGER 1967, 1970, HOTZ et al. 1999). Eine erhöhte Vitalität war allerdings nur bei den F1-Hybriden besonders ausgeprägt. Wurden hybridogenetische *R. kl. esculenta* mit ihren Elterarten gekreuzt, wiesen die Nachkommen eine vergleichbare bzw. nur leicht erhöhte Entwicklungsgeschwindigkeit auf. Auch scheinen die heterozygoten Erbanlagen nicht alle Merkmalskomplexe bei den Hybriden positiv zu beeinflussen. Während sich die Hybriden in frühen Ontogenesestadien schneller entwickelten und Sauerstoffmangel im Vergleich zu *R. ridibunda* und *R. lessonae* besser ertrugen (TUNNER & NOPP 1979), konnten keine Unterschiede bei der Gefriertoleranz (VOITURON et al. 2005) und bei der Überlebensrate während der Überwinterung (HOLENWEG PETER 2001) festgestellt werden. Ebenfalls scheint *R. kl. esculenta* gegenüber ihren Elternarten eine geringere Hitzetoleranz zu besitzen (LITVINCHUK et al. 2007).

Nach den Ergebnissen der Kreuzungsexperimente wird erneut bestätigt, dass es (1) zwischen vielen westpaläarktischen Wasserfroschformen eingeschränkte bzw. keine prä- und postzygoten Isolationsmechanismen ausgeprägt sind (vgl. KAWAMURA & NISHIOKA 1979, 1986, GÜNTHER 1982, BERGER et al. 1982, 1994), (2) kann angenommen werden, dass sich viele der eingeschleppten Wasserfrösche in den heimischen Populationen reproduzieren können, (3) ist die Vitalität vieler F1-Hybriden nicht geringer als bei homotypischen Kreuzungen (oft wahrscheinlich sogar höher). Allerdings kann nicht allein aus der höheren Entwicklungsgeschwindigkeit während der Larvalphase auf die Fitness (lebenslanger Fortpflanzungserfolg) geschlossen werden, da andere Merkmale in heterozygoter Ausprägung bei den Hybriden auch geringere Überlebenschancen bewirken könnten (z. B. das Verhalten bei der Überwinterung).

Informationen zur Fertilität der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten F1-Hybriden liegen nicht vor. Es könnte also auch sein, dass trotz der hohen Vitalität vieler Tiere am Beginn der Larvenentwicklung der reproduktive Erfolg deutlich geringer als bei den Nachkommen homotypischer Kreuzungen ist. Über den Reproduktionserfolg der Hybriden können nur Aussagen unter Berücksichtigung der Ergebnisse der genetischen Untersuchungen getroffen werden. Demnach muss von einer erfolgreichen und langfristigen Ausbreitung allochthoner Allele ausgegangen werden.

Bei Kreuzungsexperimenten zwischen anderen Wasserfroscharten gingen aus bestimmten Kreuzungsvarianten F1-Hybriden hervor, die bei Rückkreuzungen mit ihren Elternarten Fertilitätsmängel aufwiesen (BERGER et al. 1994). Demnach kann auch die Fähigkeit zur Reproduktion mit einheimischen Wasserfröschen und genetischen Introgression zwischen verschiedenen allochthonen Formen (genetische Varianten) unterschiedlich ausgeprägt sein.

4.6 Allochthone Wasserfrösche als potentielle Krankheitsüberträger

Durch Chytridiomykose-Nachweistests sollten zwei Hypothesen überprüft werden, die den Zusammenhang zwischen allochthonen Tieren und dem Krankheitserreger *Batrachochytrium dendrobatidis* betreffen:

(1) Besteht die Vermutung, dass eingeschleppte Wasserfrösche als Vektoren der Infektionskrankheit dienen und zur Verbreitung von *B. dendrobatidis* in den heimischen Populationen beitragen. (2) Es könnte ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp von Wasserfröschen und der Sensitivität gegenüber *B. dendrobatidis* bestehen.

Für allochthone Wasserfrösche als Vektoren des Erregers spricht das Vorkommen des Pilzes in Populationen, die besonders stark von allochthonen Individuen beeinflusst sind. Die Hypothese, dass *B. dendrobatidis* durch allochthone Wasserfroschformen eingeschleppt wurde, wird auch dadurch gestützt, dass sich unter 356 getesteten griechischen Wasserfröschen 11 infizierte Tiere (3,1 %) befanden (OHST et al. 2005). Die geringe Abundanz des Erregers in Griechenland (91 % der infizierten Tiere stammen von einem Fundort), könnte erklären, weshalb aus der überwiegenden Zahl aller Populationen in Deutschland (70 %), in denen Gene balkanischer Formen gefunden wurden, der Erreger nicht nachweisbar war. Allerdings ist die Gesamtzahl der infizierten Tiere und Populationen relativ klein (20 bzw. 6), so dass ein Zusammenhang mit der Einschleppung allochthoner Frösche nur vermutet werden kann.

Die Hybriden interspezifischer Kreuzungen zwischen *R. shenocephala* und *R. blairi* zeigten im Vergleich zu den parentalen Arten in Gegenwart von *B. dendrobatidis* eine verlängerte Larvalphase und reduzierte Körpermassen zum Zeitpunkt der Metamorphose (PARRIS 2004). Dagegen konnten während der Aufzucht infizierter und nicht infizierter Larven der Elternarten bei den gemessenen Parametern keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte lediglich das Auftreten der Infektion in Populationen erkannt werden, die durch balkanische Wasserfrösche beeinflusst worden sind. Die Infektion wurde entsprechend der erwarteten Häufigkeiten, bei homozygoten, heterozygoten und allochthonen wie autochthonen Individuen gefunden.

KRIGER & HERO (2007) konnten Zusammenhänge zwischen dem Gewässertyp und der Prävalenz des Erregers finden. Demnach sind vor allem Amphibien in permanenten Fließgewässern von der Infektion betroffen. Die Befallsrate an stehenden permanenten Wasserkörpern war demgegenüber nur noch ca. halb so hoch, an periodisch austrocknenden Gewässern wurden fast keine infizierten Tiere gefunden. Eines der sechs Habitate, in denen infizierte Tiere in Deutschland nachgewiesen werden konnten, wird durch ein fließendes Gewässer gebildet (Bach mit kleinen Becken), vier Populationen leben in Auen, die durch Wasserstandsschwankungen geprägt sind, aber durchgängig Wasser führen. Ein Vorkommen betrifft eine Population an einem großen, stehenden Gewässer (See). Der Gewässertyp scheint aber nur eine Voraussetzung bzw. ein untergeordneter

Faktor für das Vorkommen von *B. dendrobatidis* zu sein, da im Rahmen dieser Arbeit viele weitere, große und fließende Gewässer beprobt wurden, ohne dass der Erreger nachgewiesen werden konnte.

Die Prävalenz des Erregers an allen Fundorten in Deutschland lag insgesamt bei 6,3 %, was im Vergleich zu den Befallsraten von Amphibien in anderen Ländern als durchschnittlich anzusehen ist (siehe unten). Die Befallsrate schwankte aber stark zwischen den untersuchten Regionen in Deutschland. Während im Ruhrtal an fünf Fundstellen durchschnittlich 31,1% der Tiere infiziert waren, liegen aus dem übrigen Untersuchungsgebiet nur von zwei isolierten Populationen Nachweise mit Befallsraten von 14,3 bzw. 100 % vor. Dieses Verbreitungsmuster weist auf ein epidemisches Infektionsgeschehen hin, d.h. offensichtlich breitet sich der Erreger innerhalb einer Population schnell aus. Allerdings scheint die relativ geringe Zahl der betroffenen Populationen (sechs von 45 Wasserfroschpopulationen, ~13 %) einer schnellen Ausbreitung des Erregers zu widersprechen, zumal Wasserfrösche ein ausgeprägtes Migrationsverhalten zeigen (GÜNTHER 1968, 1974, VAN GELDERS & HOEDEMAEKERS 1971), was eine schnelle Übertragung zwischen Populationen insbesondere entlang von Flussläufen begünstigen sollte.

Neben den hier erwähnten Nachweisen wurde die Chytridiomykose bereits bei Wasserfröschen einer Population in Zentralitalien nachgewiesen. Unter 80 getesteten Tieren befanden sich vier infizierte *R. bergeri*-Individuen (5 %), ohne dass diese Symptome der Krankheit zeigten (SIMONCELLI et al. 2005). Obwohl *B. dendrobatidis* als Ursache für Massensterben und Bestandsrückgänge in vielen Amphibienpopulationen weltweit angesehen wird (z. B. BERGER et al. 1998, DASZAK et al. 2000, BOSCH et al. 2001, LIPS et al. 2005), konnten unter Wasserfröschen kaum Hinweise für eine besondere Sensitivität gegenüber dem Erreger erkannt werden. Bekannt ist lediglich ein Massensterben, das im Zusammenhang mit dem Auftreten der Chytridiomykose gestanden haben könnte. Dieses ereignete sich in einer Teichanlage bei Neuwied (Rheinland-Pfalz), wo im Februar 2003 innerhalb von zwei Tagen mehr als 200 tote Wasserfrösche (*Rana esculenta*) gefunden wurden (OHST et al. 2006). Bei drei Exemplaren, die histologisch untersucht wurden, konnte eindeutig Chytridiomykose diagnostiziert werden (MUTSCHMANN 2007).

Repräsentative Untersuchungen über die Verbreitung des Erregers und seiner Beteiligung an Bestandsrückgängen heimischer Amphibien sind aus Sicht des Naturschutzes dringend erforderlich.

Bei anderen Amphibienarten wurden über mehrjährige Beobachtungszeiträume hinweg sowie an Hand von musealem Sammlungsmaterial sehr unterschiedliche Prävalenzraten gefunden. Bei zwei Arten aus dem südlichen Afrika lagen die Befallsraten zwischen 2,7 % (*Xenopus spp.*; WELDON et al. 2004) und 42,3 % (*Afrana fuscigula*; HOPKINS & CHANNING 2003). Ebenso konnten in Australien und Nordamerika Populationen mit hohen Anteilen infizierter Amphibien festgestellt werden (z. B. bei *Taudactylus eungellensis*, *Litoria wilcoxii* und *Rana muscosa* 18 % - 28 %; RETALLICK et al. 2004, OUELLET et al. 2005, BRIGGS et al. 2005, Übersicht in OHST et al. 2006).

4.7 Schlussbetrachtungen und Handlungsempfehlungen

4.7.1 Bewertung von Neozoen

Die Ansichten zu Neozoen in der heimischen Fauna sind überaus vielfältig. Einige Beispiele sollen die oft widersprüchlichen Einstellungen gegenüber Neozoen verdeutlichen. Während der Bisam, wie eingangs erwähnt, allgemein als schädlicher Neozoe gilt, auf den zur Schadensbegrenzung Jagd gemacht wird, sind viele Fischottervorkommen auf den Bisam als Ersatznahrung angewiesen, weil die Fischbestände in deren Lebensräumen zu gering sind. Würde die Bisamratte ausgerottet, wären die Bestände der als schutzwürdig angesehenen Fischotter zusätzlich gefährdet.

Für den Schutz des zur Jagd eingebürgerten Fasans wird der unter menschlicher Mithilfe eingewanderte Marderhund bekämpft.

Naturschutz ist also Wertung und keine einfach feststellende Ökologie (REICHHOLF 1996). Gefragt sind daher individuelle Konzepte, zwischen einem gleichgültigen Umgang mit gebietsfremden Tierarten auf der einen und kleingärtnerischer Verplanung und Verwaltung von Natur auf der anderen Seite (KINZELBACH 1996). Nach KINZELBACH (1996) kann es nicht Sinn von Naturschutz sein, mit erheblichem Aufwand und Eingriffen bestimmte Zustände von Ökosystemen kurzfristig aufrecht zu erhalten. Auch wenn der ständige Wandel von Biozöosen eine grundlegende Eigenschaft der Natur darstellt, welche das Entstehen und Aussterben von Arten einschließt, so ist dagegen zu beachten, dass die Aussterberate die Zahl neu entstehender Arten zurzeit bei weitem übersteigt (VITOUSEK et al. 1997), woran global gesehen die Verbreitung gebietsfremder Arten einen bedeutenden Anteil hat (KOWARIK 2003). Über ästhetische Naturschutzaspekte hinaus, führt eine „macdonaldisierte“ Biosphäre mit global vereinheitlichten Ökosystemen, in der zukünftig wenige konkurrenzstarke Arten ähnliche ökologische Nischen besetzen, zu einer erheblichen Einschränkung nutzbarer natürlicher Ressourcen und wäre mit deutlichen Verlusten von Lebensqualität verbunden (LÖVEI 1997).

Ein Beispiel für wissenschaftlich begründete Überlegungen zu Chancen und Risiken, die mit Aussetzungen allochthoner Tiere verbunden sind, bietet die schon mehrfach angesprochene Europäische Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*). Nachdem eine Verarmung der genetischen Diversität in den reduzierten ostdeutschen Beständen festgestellt wurde, folgte der Vorschlag, Sumpfschildkröten aus den mediterranen Verbreitungsgebieten in autochthone Populationen einzubringen, um Inzuchteffekten entgegen zu wirken und die heimischen Populationen zu stützen (POSCHADEL & PARZEFALL 2003). Zu Bedenken ist allerdings, dass die Folgen einer genetischen Vermischung mit allochthonen Sumpfschildkröten den Verlust wichtiger Anpassungen bedeuten können, die auch der Gewinn genetischer Vielfalt nicht ausgleicht und nur den Verlust der Authentizität autochthoner Populationen zur Folge hat (SCHNEEWEISS 1997, SCHNEEWEISS et al. 2003). Einheimische Sumpfschildkröten weisen eine Reihe von Anpassungen an die mitteleuropäischen Klimabedingungen auf, wie etwa die jahreszeitliche Bindung an

Eiablagezeiten, häufige Überwinterung der Jungtiere in der Gelegehöhle und tiefere Gelegehöhlen als Sumpfschildkröten aus mediterranen Gebieten. Bei einer genetischen Vermischung des einheimischen Genpools mit allochthonen südeuropäischen Genomen ist ein Verlust solcher Anpassungen zu befürchten (SCHNEEWEISS 1997).

Die Aussetzung von Sumpfschildkröten scheint durch private Züchter bereits erfolgt zu sein, wie wiederholte Funde im Einklang mit populationsgenetischen Untersuchungen zeigten (POSCHADEL & PARZEFALL 2003). Sinnvollere Unterstützung könnte die einheimische Sumpfschildkröte wohl eher durch ein Erhaltungszuchtprogramm erfahren.

Ähnliche Gefährdungspotentiale bestehen auch für die Smaragdeidechse (*Lacerta viridis*) sowie die Zauneidechse (*L. agilis*), bei deren nordeuropäischen Populationen kürzere Eizeitigungsdauern als bei den weiter südlich gelegenen festgestellt wurden (RYKENA 1988, GEIGER & WAITZMANN 1996).

Aus dem derzeitigen Kenntnisstand über die Auswirkungen und Gefahren, die sich durch Einschleppungen von Neozoen bzw. allochthonen Tierarten ergeben, können folgende Konsequenzen gezogen werden (nach KINZELBACH 1996 und GHERARDI 2000):

- Es sollte die Erforschung von Interaktionen zwischen eingeschleppten und einheimischen Arten gefördert werden.
- Erkenntnisse sollten in praktisches Handeln umgesetzt werden. Dies kann die Bekämpfung von besonders schädlichen Neozoen sein oder in Fällen geschehen, in denen eine vollständige Beseitigung aus der heimischen Fauna noch möglich und erwünscht ist (z. B. Ochsenfrosch). Weiterhin können besondere Schutzgebiete ausgewiesen werden, in denen bedrohte, rein autochthone Populationen vorkommen.
- Erforderlich ist auch eine verstärkte Sensibilisierung der Bevölkerung sowie der zuständigen Behörden für das Thema, um Aussetzungen gebietsfremder Tierarten so weit wie möglich einzudämmen. Dabei ist eine differenzierte Darlegung über Auswirkungen von Neozoen gegenüber der Öffentlichkeit wichtig, damit Anregungen zur „Selbstjustiz“ vermieden werden (BÖHME 2000).
- Es sollten klare und spürbare Strafen eingeführt werden, um Gesetzten zum Schutz vor der Verbreitung gebietsfremder Arten Nachdruck zu verleihen.

4.7.2 Bedeutung und weitere Entwicklung allochthoner Wasserfrösche

Nach den Ergebnissen der genetischen und biogeographischen Untersuchungen sowie den Ergebnissen von Kreuzungsexperimenten folgt, dass generelle Aussagen über die zukünftige Entwicklung allochthoner Formen in Deutschland gegenwärtig nicht möglich sind. Vermutlich werden Hybridenbildungen zwischen einheimischen Wasserfröschen und allochthonen Formen, je nach den genetischen Varianten, in unterschiedlichem Maße möglich sein.

Zu bedenken ist dabei, dass die klimatischen Verhältnisse in Zentraleuropa deutliche Unterschiede zu den Bedingungen in Griechenland, Anatolien und auch zur Balkanregion aufweisen. In Gefangenschaft (im Freiland, Poznan, Polen) wurde beobachtet, dass südeuropäische Wasserfroschformen im Gegensatz zu zentraleuropäischen innerhalb einer Fortpflanzungsperiode mitunter mehrfach ovulieren (BERGER 1994). Die Fortpflanzungsperioden in südeuropäischen Populationen von *R. ridibunda* beginnen in der Regel etwa 4-6 Wochen früher als in Mitteleuropa (GÜNTHER 1990, NÖLLERT & NÖLLERT 1992), was den Jungtieren vor der ersten Winterruhe mehr Zeit für Nahrungsaufnahme und Wachstum gibt. Es könnte erwartet werden, dass die strengeren und längeren Winter, die in extremen Fällen schon unter autochthonen Populationen hohe Verluste verursachen (BERGER 1982), zusammen mit kürzeren Fortpflanzungsperioden in den zentraleuropäischen Lebensräumen, limitierend für das Überleben ausgesetzter Tiere sind. Dennoch kann angesichts der erkennbaren positiven Bestandentwicklungen von Seefroschpopulationen (z. B. im Ruhrtal, am Oberrhein und der Schweiz) davon ausgegangen werden, dass die Ausbreitung allochthoner Genomvarianten weiter anhält. Die in einigen Gebieten der Schweiz ausgesetzten *R. ridibunda*-ähnlichen Formen konnten dort überleben und sich reproduzieren. Die ausgesetzten Formen sind weiterhin so konkurrenzstark, dass es zu einer Verdrängung der etwas kleineren, hybriden, aber in Europa weit verbreiteten Wasserfroschform *R. kl. esculenta* kommt (VORBURGER & REYER 2003).

Der mit einer Erwärmung einhergehende Klimawandel könnte die Lebensbedingungen für allochthone Wasserfrösche bzw. deren an südeuropäische Klimabedingungen adaptierten Genomvarianten begünstigen und die erfolgreiche und dauerhafte Etablierung eingeschleppter Wasserfrösche weiter erleichtern. Bei steigenden Temperaturen werden jahreszeitlich früher einsetzende Fortpflanzungsperioden in Mitteleuropa wahrscheinlich (BEEBEE 1995, TRYJANOWSKI et al. 2003), vergleichbar den gegenwärtigen Reproduktionszyklen in südeuropäischen Lebensräumen. Darüber hinaus kann bei höheren Temperaturen mit einer, zumindest periodisch, stärkeren Austrocknung von Gewässern bzw. dem völligen Verschwinden kleiner, bisher wenig beeinflusster Feuchtgebiete gerechnet werden (ARAÚJO et al. 2006). Im Zusammenwirken mit den klimatischen Veränderungen können die Einflüsse allochthoner Wasserfrösche also durchaus noch verstärkt werden.

4.7.3 Braucht Zentraleuropa mehr Wasserfroschformen?

Wie mehrfach dargelegt, ist die genetische Diversität der Wasserfrösche vor allem in Südosteuropa und Anatolien bedeutend höher als in Zentraleuropa. Dies kann auf die nacheiszeitliche Besiedlung Mittel- und Nordeuropas, ausgehend von wenigen Populationen zurückgeführt werden. Auch wenn die stärkere geographische Gliederung der südeuropäischen Lebensräume Diversifikationen und allopatrische Artbildung begünstigt, kann sicher davon ausgegangen werden, dass sich bei einer nicht durch Vergletscherungen unterbrochenen Besiedlung Zentraleuropas, auch hier eine vielfältigere Wasserfroschfauna herausgebildet bzw. erhalten hätte. Die Aussetzungen gebietsfremder Wasserfrösche beschleunigen damit die Diversifizierung der Herpetofauna erheblich über das natürliche Maß. Es stellt sich die Frage, ob diese künstliche Erhöhung der Formenvielfalt grundsätzlich abzulehnen ist, ob nicht autochthone Wasserfrösche mit weiteren Arten an heimischen Gewässern koexistieren oder hybridisieren könnten?

Die meisten Naturschützer und Ökologen würden das Aussetzen gebietsfremder Tierarten sicher klar als Faunenverfälschung ablehnen und auf mögliche ökologische und wirtschaftliche Schäden verweisen. Wie sollen demnach allochthone Wasserfrösche in heimischen Populationen beurteilt werden?

Die Kreuzbarkeit vieler Wasserfroscharten, insbesondere der *R. ridibunda*-ähnlichen Formen, führt zur genetischen Durchmischung eigenständiger evolutionärer Linien, die sich am Beginn eines möglichen Speziationsprozesses befinden. Es ist anzunehmen, dass autochthone *R. ridibunda*-Populationen spezielle Adaptationen erworben haben, die in den nördlichen Randgebieten ihres Areals entscheidend für ein dauerhaftes Überleben sind. Der Verlust spezieller Anpassungen kann die ohnehin vielfältig bedrohten Froschpopulationen zusätzlich negativ beeinflussen. Aber selbst wenn das Einbringen allochthoner Allele in den Genpool einheimischer Wasserfrösche zu keiner erkennbaren Beeinflussung der autochthonen Populationen führt, kann dies den Verlust von evolutionärer Eigenständigkeit und Diversität bedeuten. Daher sollte der weiteren Verbreitung allochthoner Wasserfrösche nach Möglichkeit entgegen gewirkt werden.

Auf Grund der vermutlich häufigen Hybridisierungen zwischen allochthonen und autochthonen Wasserfröschen können die allochthonen Allele nicht mehr aus den einheimischen Populationen entfernt werden. Weiterhin ist die Diskriminierung allochthoner Individuen bzw. Hybriden von autochthonen Fröschen unter feldbiologischen Bedingungen kaum möglich.

Der gegenwärtige, durch menschliche Einwirkung veränderte Zustand der Wasserfroschfauna, muss also akzeptiert und als Einheit bestmöglich geschützt werden. Weitergehende Untersuchungen zur Verbreitung allochthoner Wasserfrösche sowie ihrer langfristigen Wirkungen auf einheimische Populationen können wertvolle Informationen liefern, auf deren Grundlage effektive Schutzmaßnahmen möglich sind.

5 ABKÜRZUNGEN

* / ?	vermutlich allochthonen / fraglich ob allochthon oder autochthon
A1 / 2	ITS2-Allel1 / 2
A,C,G,T	Nukleotide (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin)
Amp ⁺	Ampicillinresistenz
Bd	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
Bp	Basenpaare
CI	Konsistenz (<i>consistency</i>) Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg
GTR-Model	<i>General Time Reversible Model</i> (Sequenzevolutionsmodell)
HI	Homoplasieindex
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITS1 / 2	<i>Internal Transcribed Spacer</i> 1 / 2
JC-Model	Jukes-Cantor (Sequenzevolutionsmodell)
LE-System	Populationssystem, in dem <i>R. lessonae</i> und <i>R. kl. esculenta</i> syntop vorkommen
LHRH	Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon
lsu	large subunit (ribosomale Untereinheit)
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony
mt	mitochondrial
n	nukleär
n. b.	nicht bestimmt
ND3/2	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3 / 2 (mt-Gene)
p-Distanz	unkorrigierte genetische Distanz
PAUP	<i>Phylogenetic Analysis Using Parsimony</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RE-System	Populationssystem, in dem <i>R. ridibunda</i> und <i>R. kl. esculenta</i> syntop vorkommen
rekRL	rekombinierte ITS2-Sequenz
RI	Retentions (<i>retention</i>) Index
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RNA	Ribonukleinsäure
ssu	<i>small subunit</i> (ribosomale Untereinheit)
Ts	Transition
Tv	Transversion
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
DMSO	Dimethylsulfoxid
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase

Länderabkürzungen (Kfz-Kennzeichen)

AR	Armenien	ET	Ägypten	PL	Polen
BB	Brandenburg	F	Frankreich	RO	Rumänien
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	RUS	Russland
BW	Baden-Württemberg	I	Italien	S	Schweden
CG	Montenegro	JOR	Jordanien	SLO	Slowenien
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SYR	Syrien
CY	Zypern	LAR	Libyen	TM	Turkmenistan
D	Deutschland	MA	Marokko	TR	Türkei
DZ	Algerien	P	Portugal	UKR	Ukraine

6 LITERATUR

- ALPHEY, L. (1998): DNA-Sequenzierung. Spektrum Akademischer Verlag. 242 pp.
- ANNIS, S. L., F. P. DASTOOR, H. ZIEL, P. DASZAK & J. E. LONGCORE (2004): A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *J. Wildl. Dis.* 40 (3): 420-428.
- ARANO, B., G. A. LLORENTE, M. GARCIA-PARIS & P. HERRERO (1995): Species translocation menaces Iberian water frogs. *Conserv. Biol.* 9 (1): 196-198.
- ARANO, B., G. A. LLORENTE, A. MONTORI, D. BUCKLEY & P. HERRERO (1998): Diversification in north-west African water frogs: molecular and morphological evidence. *Herpetol. J.* 8: 57-64.
- ARAÚJO, M. B., W. THUILLER & R. G. PEARSON (2006): Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *J. Biogeogr.* 33: 1712-1728.
- ARIKAN, H. (1988): On a new form *Rana ridibunda* (Anura Ranidae) from Turkey. *Istanbul Üniv. Fen. Fak. Biyoloji Der.* 53: 81-87.
- ASQUITH, A. (1995): Alien species and the extinction crisis of Hawaii's Invertebrates. *Endangered Species UPDATE* 12 (6): 1-8.
- BALLETTO, E., M. A. CHERCHI, S. SALVIDIO, A. LATTES, A. MALACRIDA, G. GASPERI, G. DORIA (1986): Area effect in South Western European green frogs (Amphibia, Ranidae). *Boll. Zool.* 53: 97-109.
- BANKS, B. & T. J. C. BEEBEE (1987): Spawn predation and larval growth inhibition as mechanisms for niche separation in anurans. *Oecologia* (Berlin) 72: 569-573.
- BEEBEE, T. J. C. (1991): Purification of an agent causing growth inhibition in anuran larvae and its identification as a unicellular unpigmented alga. *Can. J. Zool.* 69: 2146-2153.
- BEEBEE, T. J. C. (1995): Amphibian breeding and climate. *Nature* 374: 219-220.
- BEEBEE, T. J. C., J. BUCKLEY, I. EVANS, J. P. FOSTER, A. H. GENT, C. P. GLEED-OWEN, G. KELLY, G. ROWE, C. SNELL, J. T. WYCHERLEY & I. ZEISSET (2005): Neglected native or undesirable alien? Resolution of a conservation dilemma concerning the pool frog *Rana lessonae*. *Biodivers. Conserv.* 14 (7): 1607-1626.
- BEEBEE, T. J. C. & G. ROWE (2001): Application of genetic bottleneck testing to the investigation of amphibian declines: a case study with Natterjack Toads. *Conserv. Biol.* 15 (1): 266-270.
- BEERLI, P., H. HOTZ, H. G. TUNNER, S. HEPPICH & T. UZZELL (1994): Two new water frog species from the Aegean Islands Crete and Karpathos (Amphibia, Salientia, Ranidae). *Notulae Naturae Acad. Nat. Sci. Philadelphia* 470: 1-9.
- BEERLI, P., H. HOTZ & T. UZZELL (1996): Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for Aegean water frogs. *Evolution* 50 (4): 1676-1687.
- BERGER, L. (1967): Embryonal and larval development of F1-generation of green frogs different combinations. *Acta Zool. Cracov.* 12: 123-160.
- BERGER, L. (1968): The effect of inhibitory agents in the development of green-frog tadpoles. *Zool. Pol.* 18: 381-390.
- BERGER, L. (1968b): Morphology of F1-generation of various crosses within *Rana esculenta*-complex. *Acta Zool. Cracoviensia* 13: 301-324.
- BERGER, L. (1970): Some characteristics of the crosses within *Rana esculenta* complex in postlarval development. *Ann. Zool. Warszawa* 27: 373-408.
- BERGER, L. (1982): Hibernation of European water frogs (*Rana esculenta* complex). *Zool. Pol.* 29: 57-72.
- BERGER, L. (1988): Principles of studies of European water frogs. *Acta Zool. Cracov.* 31: 563-580.
- BERGER, L. (1994): Some peculiar phenomena in European water frogs. *Zool. Pol.* 39 (3-4): 267-280.
- BERGER, L., R. SPEARE, P. DASZAK, D. E. GREEN, A. A. CUNNINGHAM, C. L. GOGGIN, R. SLOCOMBE, M. A. RAGAN, A. H. HYATT, K. R. McDONALD, H. B. HINES, K. R. LIPS, G. MARANTELLI & H. PARKES (1998): Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9031-9036.
- BERGER, L., R. SPEARE, H. HINES, G. MARANTELLI, A. D. HYATT, K. R. McDONALD, L. F. SKERRATT, V. OLSEN, J. M. CLARKE, G. GILLESPIE, M. MAHONY, N. SHEPPARD, C. WILLIAMS & M. TYLER. (2004): Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Aust. Vet. J.* 82: 31-36.

- BERGER, L., T. UZZELL & H. HOTZ (1982): Crossing experiments between some Western Palearctic species of water frogs (Salienta: Ranidae). *Vertebr. Hung.* 21: 33-45.
- BERGER, L., T. UZZELL & H. HOTZ (1994): Postzygotic reproductive isolation between mendelian species of European water frogs. *Zool. Pol.* 39 (3-4): 209-242.
- BHANGALE, T. R., M. STEPHENS & D. A. NICKERSON (2006): Automating resequencing-based detection of insertion-deletion polymorphisms. *Nat. Genet.* 38 (12): 1457-1462.
- BLACKBURN, T. M., P. CASSEY, R. P. DUNCAN, K. L. EVANS & K. J. GASTON (2004): Avian extinction and mammalian introductions on oceanic islands. *Science* 305: 1955-1958.
- BÖHME, W. (2000): When does a foreign species deserve a "permit of residence"? Non-indigenous species (NIS): examples of varying exoticness and varying immigration age, taken from herpetology. *Ethol. Ecol. Evol.* 12: 329-333.
- BORKIN, L. J., S. N. LITVINCHUK, E. I. MANNAPOVA, M. V. PESTOV & J. M. ROSANOV (2002): The distribution of green frogs (*Rana esculenta* complex) in Nizhny Novgorod Province, central European Russia. *Russ. J. Herpet.* 9: 195-208.
- BOSCH, J., I. MARTINEZ-SOLANO & M. GARCIA-PARÍS (2001): Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biol. Conserv.* 97: 331-337.
- BOYLE, D. G., D. B. BOYLE, V. OLSEN, J. A. T. MORGAN & A. D. HYATT (2004): Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org.* 60:141-148.
- BRIGGS, C. J., V. T. VREDENBURG, R. A. KNAPP & L. J. RACHOWICZ (2005): Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: An emerging infectious disease of amphibians. *Ecology* 86 (12): 3149-3159.
- BROWN, D. D., P. C. WENSINK & E. JORDAN (1972): A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J. Mol. Biol.* 63 (1): 57-73.
- BUCKLEY, D., B. ARANO, P. HERRERO, G. A. LLORENTE & M. ESTEBAN (1994): Moroccan water frogs vs *R. perezi*: allozyme studies show up their differences. *Zool. Pol.* 39 (3-4): 377-385.
- BUFO (2005): Atlas préliminaire de répartition des amphibiens et reptiles d'Alsace. - Bufo contacts-Association pour l'Etude et la Protection des Amphibiens et Reptiles d'Alsace, Colmar, Feuillet.
- BURGHause, F. (1996): 40 Jahre Bisam in Rheinland-Pfalz. Die Bedeutung eines eingewanderten Nagers und die Bemühungen, seinen Schaden einzudämmen. *Mainzer naturwiss. Arch.* 34: 119-138.
- CLARK, A. G. (1990): Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Mol. Biol. Evol.* 7 (2): 111-122.
- CLARK, A. G., K. M. WEISS, D. A. NICKERSON, S. L. TAYLOR, A. BUCHANAN, J. STENGÅRD, V. SALOMAA, E. VARTIAINEN, M. PEROLA, E. BOERWINKLE & C. F. SING (1998): Haplotype structure and population genetic inferences from nucleotide-sequence variation in human Lipoprotein Lipase. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 595-612.
- CLARKE, L. A., C. S. REBELO, J. GONCALVES, M. G. BOAVIDA & P. JORDAN (2001): PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* 54: 351-353.
- COCKBURN, A. (1995): *Evolutionsökologie*. Gustav Fischer Verlag. 357 pp.
- DASZAK, P., L. BERGER, A. A. CUNNINGHAM, A. D. HYATT, D. E. GREEN & R. SPEARE (2000): Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 735-748.
- DENDUANGBORIPANT, J. & Q. C. B. CRONK (2000): High intraindividual variation in internal transcribed spacer sequences in *Aeschynanthus* (Gesneriaceae): implications for phylogenetics. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 1407-1415.
- DOVER, G. A. (1982): Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117.
- DOVER, G. A. (1986): Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet.* 2: 159-165.
- DOVER, G. A. (1989): Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics* 122: 249-252.
- DUBOIS, A. & R. GÜNTHER (1982): Klepton and synklepton: two new evolutionary systematic categories in zoology. *Zool. Jb. Syst.* 109: 290-305.

- DUBOIS, A. & A. OHLER (1994): Frogs of the subgenus *Pelophylax* (Amphibia, Anura, Genus *Rana*): a catalogue with comments on name-bearing types, complete synonymies, proposed common names, and maps showing all type localities. *Zool. Pol.* 39: 139-204.
- EBENDAL, T. (1979): Distribution, morphology and taxonomy of the Swedish green frogs (*Rana esculenta* Komplex). *Mitt. Zool. Mus. Berlin* 55 (1): 143-152.
- EBENDAHL, T. & T. UZZELL (1982): Ploidy and immunological distance in Swedish water frogs (*Rana esculenta* complex). *Amphibia-Reptilia* 3: 125-133.
- ENGELMANN, W.-E. (1973): Zur Frage der verwandtschaftlichen Beziehungen europäischer Grünfrösche (Gattung *Rana*). *Zool. Jb. Syst.* 100: 183-196.
- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits in phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
- FOG, K. (1994): Water frogs in Denmark: population types and biology. *Zool. Pol.* 39(3-4): 305-330.
- FOSTER, J. (2005): Information note, University of Sussex, 4.08.2005. www.sussex.ac.uk/press_office/media/media499.shtml.
- FRITZ, U. (1996): Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) 5b. Intraspezifische Hierarchie und Zoogeographie (Reptilia: Testudines: Emydidae). *Zool. Abh. Mus. Tierk. Dresden* 49 (2): 31-71.
- FURLONG, J. C. & B. E. MADEN (1983): Patterns of major divergence between the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in *Xenopus borealis* and *Xenopus laevis*, and of minimal divergence within ribosomal coding regions. *EMBO J.* 2 (3): 443-448.
- GARNER, T. W. J., M. W. PERKINS, P. GOVINDARAJULU, D. SEGLIE, S. WALKER, A. A. CUNNINGHAM & M. C. FISHER (2006): The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol. Lett.* 2: 455-459. (doi:10.1098/rsbl.2006.0494).
- GEIGER, A. & M. WAITZMANN (1996): Überlebensfähigkeit allochthoner Amphibien und Reptilien in Deutschland – Konsequenzen für den Artenschutz -. In: Gebhardt, H., R. Kinzelbach & S. Schmidt-Fischer [Hrsg.]: *Gebietsfremde Tierarten*. Ecomed Verlagsgesellschaft. Landsberg. 314 pp.
- GEITER, O., S. HOMMA & R. KINZELBACH (2002): Bestandsaufnahme und Bewertung von Neozoen in Deutschland. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit - UBA-FB 000215, Berlin.
- GELDER, J. J. VAN & H. C. M. HOEDEMAEKERS (1971): Sound activity and migration during the breeding period of *Rana temporaria* L., *R. arvalis* Nilsson, *Pelobates fuscus* Laur., and *Rana esculenta* L.. *J. Anim. Ecol.* 40: 559-568.
- GERBI, S. A. (1986): The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. *BioSystems* 19: 247-258.
- GHERARDI, F. (2000): Are non-indigenous species „ecological malignancies“? *Ethol. Ecol. Evol.* 12: 323-328.
- GIRIBET, G. & W.C. WHEELER (1999): On Gaps. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13 (1): 132-143.
- GOLOBOFF, P. A. (1993): Estimating character weighting during tree search. *Cladistics* 9: 83-91.
- GOLOBOFF, P. A. (1995): Parsimony and weighting: a reply to Turner and Zandee. *Cladistics* 11: 91-104.
- GONZALES, I. L. & J. E. SYLVESTER (1995): Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenec spacer. *Genomics* 27: 320-328.
- GRAF J. D., F. KARCH & M. C. MOREILLON (1977): Biochemical variation in the *Rana esculenta* complex: A new hybrid form related to *Rana perezi* and *Rana ridibunda*. *Experientia* 33: 1582-1584.
- GRAF, J. D. & M. POLLS PELAZ (1989): Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. In: Dawley, R. M. & J. P. Bogart (eds.): *Evolution and ecology of Unisexual Vertebrates*. Bulletin 466, The New York State Museum, Albany. 302 pp.
- GRAY, M. W. (1989): Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annul. Rev. Cell. Biol.* 5: 25-50.
- GROSSENBACHER, K. (1988): Verbreitung der Wasserfrösche in der Schweiz. In: Günther, R. & R. Klewen [Hrsg.]: *Beiträge zur Biologie und Bibliographie (1960-1987) der europäischen Wasserfrösche*. *Jb. Feldherp. Beiheft* 1: 129-134.
- GROZDANOV, P., O. GEORGIEV & L. KARAGYOZOV (2003): Complete sequence of the 45-kb mouse ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics* 82: 637-643.
- GÜNTHER, R. (1968): Morphologische und ökologische Untersuchungen zur Unterscheidung von *Rana esculenta* L. und *Rana ridibunda* Pall. *Zool. Jb. Syst.* 95: 229-264.

- GÜNTHER, R. (1973): Über die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den europäischen Grünfröschen und den Bastardcharakter von *Rana esculenta* L. (Anura). Zool. Anz., Leipzig 190: 250-285.
- GÜNTHER, R. (1974): Neue Daten zur Verbreitung und Ökologie der Grünfrösche (Anura, Ranidae) in der DDR. Mitt. Zool. Mus. Berlin 50: 287-298.
- GÜNTHER, R. (1982): Ergebnisse experimenteller Kreuzungen zwischen Wasserfröschen (Anura, Ranidae) aus verschiedenen Ländern Europas und Mittelasiens. Vertebr. Hung. 21: 157-167.
- GÜNTHER, R. (1983): Zur Populationsgenetik der mitteleuropäischen Wasserfrösche des *Rana esculenta*-Synkleptons (Anura, Ranidae). Zool. Anz., Jena 211: 43-54.
- GÜNTHER, R. (1990): Die Wasserfrösche Europas. Die Neue Brehm-Bücherei 600, A. Ziemsen Verlag, Wittenberg-Lutherstadt. 288 pp.
- GÜNTHER, R. (1997): *Rana lessonae* Camerano, 1882. In: Gasc, J.-P., A. Cabela, J. Crnobrnja-Isailovic, D. Dolmen, K. Grossenbacher, P. Haffner, J. Lescure, H. Martens, M. E. Oliveira, T. S. Sovianidou, M. Veith & A. Zuiderwijk (eds.): Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe: 148-149. Paris. 494 pp.
- GÜNTHER, R. & J. PLÖTNER (1994): Morphometric, enzymological and bioacoustic studies in Italian water frogs (Amphibia: Ranidae). Zool. Pol. 39 (3-4): 387-415.
- HARRIS, D. J., V. BATISTA & M. A. CARRETERO (2003): Diversity of 12S mitochondrial DNA sequences in Iberian and North-west African water frogs across predicted geographic barriers. Herpetozoa 16 (1/2): 81-83.
- HARRIS, D. J. & K. A. CRANDALL (2000): Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. Mol. Biol. Evol. 17 (2): 284-291.
- HEUSSER, H. (1972): Intra- und interspezifische Crowding-Effekte bei Kaulquappen einheimischer Anuren-Arten. Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich 117: 121-128.
- HEWITT, G. M. (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. Biol. J. Linn. Soc. 68: 87-112.
- HINDAR, K. (1999): Introduction at the level of genes and populations. In: Sandlund, O. T., P. J. Schei & A. Viken [Hrsg.]: Invasive Species and Biodiversity Management. Kluwer Academic Publisher. 448 pp.
- HLINKA, O., A. MURRELL & S. C. BARKER (2002): Evolution of the secondary structure of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in hard ticks (Ixodidae, Arthropoda). Heredity 88: 275-279.
- HOCHWALD, S. (1990): Bestandsgefährdung seltener Muschelarten durch den Bisam (*Ondatra zibethica*). Schriftenr. Bayer. Landesamt für Umweltschutz 97: 113-114.
- HOLENWEIG PETER, A.-K. (2001): Survival in adults of the water frog *Rana lessonae* and its hybridogenetic associated *Rana esculenta*. Can. J. Zool. 79 (4): 652-661.
- HOLLAND, B. S. (2001): Invasion without a bottleneck: microsatellite variation in natural and invasive populations of the Brown Mussel *Perna perna* (L.). Mar. Biotechnol. 3: 407-415.
- HOOGMOED, M. S. (1975): On the presence of *Rana ridibunda* *ridibunda* Pallas in the Netherlands. Zool. Bijdragen, Leiden 17: 72-76.
- HOPKINS, S. & A. CHANNING (2003): Chytrid fungus in Northern and Western Cape frog populations, South Africa. Herpetol. Rev. 34 (4): 334-336.
- HOTZ, H., R. D. SEMLITSCH, E. GUTMANN, G.-D. GUÉX & P. BEERLI (1999): Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal frog hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2171-2176.
- HOTZ, H. & T. UZZELL (1982): Biochemical detected sympatry of two water frog species: two different cases in the Adriatic Balkans (Amphibia: Ranidae). Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 134: 50-79.
- HOTZ, H., T. UZZELL, G.-D. GUÉX, D. ALPERS, R. D. SEMLITSCH & P. BEERLI (2001): Microsatellites: a tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic water frogs. Mitt. Mus. Naturkd. Berlin, Zool. Reihe 77: 43-50.
- HUGHES, B., I. HENDERSON & P. ROBERTSON (2006): Conservation of the globally threatened white-headed duck, *Oxyura leucocephala*, in the face of hybridisation with the North American ruddy duck, *Oxyura jamaicensis*: results of a control trial. Acta Zool. Sinica 52: 576-578.
- JDEIDI, T., C. C. BILGIN & M. KENCE (2001): Morphometric and bioacoustic studies in the water frog (*Rana ridibunda*) complex in Turkey. J. Morphol. 248: 245-246. (ICVM-6, Jena, Abstract)
- JOB, G. (2007): TREEFINDER version of May 2007. Munich, Germany. Distributed by the author at: www.treefinder.de.

- JUKES, T. H. & C. R. CANTOR (1969): Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (Hrsg.): Mammalian Protein Metabolism. New York, Academic Press. 588 pp.
- KAWAMURA, T. & M. NISHIOKA (1979): Isolating mechanisms among the water frog species distributed in the Palearctic region. Mitt. Zool. Mus. Berlin 55: 171-185.
- KAWAMURA, T. & M. NISHIOKA (1986): Hybridization experiments among *Rana lessonae*, *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*, with special reference to hybridogenesis. Sci. Rep. Lab. Amphib. Biol. Hiroshima Univ. 8: 117-271.
- KINZELBACH, R. (1996): Die Neozoen. In: Gebhardt, H., R. Kinzelbach & S. Schmidt-Fischer [Hrsg.]: Gebietsfremde Tierarten. Ecomed Verlagsgesellschaft. Landsberg.
- KNOOP, V. & K. MÜLLER (2006): Gene und Stammbäume. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München. 310 pp.
- KOK, P. J. R. (2001): Note sur l'introduction de *Rana bedriagae* Camerano, 1882 (Anura, Ranidae) en Belgique et ses possibles implication sur la batrachofaune indigène. Natural. belges 82: 25-30.
- KORDGES, T. (1988): Zur Wasserfroschproblematik in Ballungsräumen - eine Essener Fallstudie. Jb. Feldherp. Beiheft 1: 97-104.
- KOWARIK, I. (2003): Biologische Invasionen – Neophyten und Neozoen in Mitteleuropa. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart. 320 pp.
- KRIGER, K. M. & J.-M. HERO (2007): The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. Diversity and Distributions. (OnlineEarly Articles) doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00394.x.
- KUMAR, S., K. TAMURA & M. NEI (2004): MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5: 150-163.
- LANZA, B. (1962): On the introduction of *Rana ridibunda* Pallas and *Rana catesbeiana* Shaw in Italy. Copeia 1962: 642-643.
- LAUFER, H. (2001): Wissenschaftliche Begleituntersuchungen zum Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*) am Oberrhein nördlich Karlsruhe. Gutachten i. A. der Landesanstalt für Umweltschutz, Karlsruhe. 36 pp.
- LAUFER, H. & A. SANDTE (2004): Hinweise zur Konkurrenz zwischen eingeschlepptem Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*) und einheimischen Grünfröschen. herpetofauna 143: 29-38.
- LAUFER, H. & M. WAITZMANN (2002): Der Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*) am nördlichen Oberrhein (Baden-Württemberg). herpetofauna 24 (136): 5-14.
- LENK, P., U. FRITZ, U. JOGER & M. WINK (1999): Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). Mol. Ecol. 8: 1911-1922.
- LE PAGE, S. L., R. A. LIVERMORE, D. W. COOPER & A. C. TAYLOR (2000): Genetic analysis of a documented population bottleneck: introduced Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in New Zealand. Mol. Ecol. 9: 753-763.
- LI, W.-H. (1997): Molecular Evolution. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- LIPS, K. R., P. A. BURROWES, J. R. MENDELSON & G. PARRA-OLEA (2005): Amphibian population declines in Latin America: A synthesis. Biotropica 37 (2): 222-226.
- LITVINCHUK, S. N., I. M. PASHKOVA, YU. M. ROZANOV & L. YA. BORKIN (2007): Heat resistance of the skeletal muscle in Western Palearctic green frogs (*Rana esculenta* complex). Biol. Bull. 34 (1): 61-66.
- LIVO, L. J. (2003): Methods for obtaining *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) samples for PCR testing. In: Colorado Division of Wildlife Boreal Toad Research Report 2003. 68 pp.
- LJUBISAVLJEVIC, K., G. DZUKIC & M. KALEZIC (2003): Green frogs are greatly endangered in Serbia and Montenegro. Froglog 58. www.open.ac.uk/daptf/froglog/froglog-58-3.html.
- LONGCORE, J. E., A. P. PESSIER & D. K. NICHOLS (1999): *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia 91: 219-227.
- LÖVEI, G. L. (1997): Global change through invasion. Nature 388: 627-628.
- LYMBERAKIS, P., N. POULAKAKIS, G. MANTHALOU, C. S. TSIGENOPOULOS, A. MAGOULAS & M. MYLONAS (2007): Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) populations in the Eastern Mediterranean region. Mol. Phylogenet. Evol. 44: 115-125.
- MACK, R. N., D. SIMBERLOFF & W. M. LONSDALE (2000): Biotic Invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. Ecol. Appl. 10 (3): 689-710.

- MAUDET, C., C. MILLER, B. BASSANO, C. BREITENMOSER-WÜRSTEN, D. GAUTHIER, G. OBEXER-RUFF, J. MICHALLET, P. TABERLET & G. LUIKART (2002): Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex* (ibex)]. *Mol. Ecol.* 11: 412-436.
- MEYER, A. (1993): Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka, P. W. & T. P. Mommsen: *The Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2. Elsevier Science Publisher, New York. 484 pp.
- MICHOT, B., N. JOSEPH, S. MAZAN & J. P. BACHELLERIE (1999): Evolutionarily conserved structural features in the ITS2 of mammalian pre-rRNAs and potential interactions with the snoRNA U8 detected by comparative analysis of new mouse sequences. *Nucleic Acids Res.* 27 (11): 2271-2282.
- MIURA, I., H. OKUMOTO, K. MAKINO, A. NAKATA & M. NISHIOKA (1995): Analysis of the tyrosinase gene of the Japanese pond frog, *Rana nigromaculata*: Cloning and nucleotide sequence of the genomic DNA containing the tyrosinase gene and its flanking regions. *Jpn. J. Genet.* 70: 79-92.
- MOULIA, C. (1999): Parasitism of plant and animal hybrids: are facts and fates the same? *Ecology* 80 (2): 392-406.
- MUTHS, E., P. S. CORN, A. P. PESSIER & D. E. GREEN (2003): Evidence for disease related amphibian decline in Colorado. *Biol. Conserv.* 110: 357-365.
- MUTSCHMANN, F. (2007): Chytridiomycosis in amphibians – an overview. In: Seybold J. & F. Mutschmann (eds.): *Proceedings of the 7th International Symposium on Pathology and Medicine in Reptiles and Amphibians* (Berlin 2004). *Frankfurter Beiträge zur Naturkunde, Band 29*. Verlag Chimaira.
- NENTWIG, W. (2007): Neozoen. Warum es wichtig ist, gebietsfremde Tierarten zu bekämpfen. *Nat.wiss. Rundsch.*, 60. Jahrgang, Heft 11: 565-572.
- NÖLLERT, A. & C. NÖLLERT (1992): *Die Amphibien Europas*. Franckh-Kosmos Verlag, Stuttgart. 382 pp.
- NUES, R. W. VAN, J. M. J. RIENTJES, S. A. MORRÉ, E. MOLLEE, R. J. PLANTA, J. VENEMA & H. A. RAUÉ (1995): Evolutionarily conserved structural elements are critical for processing of internal transcribed spacer 2 from *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 250: 24-36.
- OBERBAUER, A. M., D. I. GROSSMAN, M. L. EGGLESTON, D. N. IRION, A. L. SCHAFER, N. C. PEDERSEN & J. M. BELANGER (2003). Alternatives to blood as a source of DNA for large-scale scanning studies of canine genome linkage. *Vet. Res. Commun.* 27: 27-38.
- O'DONNELL, C. F. J. (1996): Predators and the decline of New Zealand forest birds: an introduction to the hole-nesting bird and predator programme. *New Zeal. J. Zool.* 23: 213-219.
- ODORICO, D. M. & D. J. MILLER (1997): Variation in the ribosomal internal transcribed spacer and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): pattern of variation consistent with reticulate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 14 (5): 465-473.
- OLDEN, J. D., N. L. POFF, M. R. DOUGLAS, M. E. DOUGLAS & K. D. FAUSCH (2004): Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends Ecol. Evol.* 19 (1): 18-24.
- OHST, T. (2001): Untersuchungen zur stammesgeschichtlichen Entwicklung des westpaläarktischen Wasserfroschkomplexes (Anura, Ranidae) auf der Grundlage von DNA-Sequenzen des mitochondrialen ND2- und ND3-Gens. *Dipl. Arb. Humboldt-Univ. Berlin*.
- OHST, T., Y. GRÄSER, F. MUTSCHMANN & J. PLÖTNER (2005): The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* - a threat to global amphibian populations. *Mycoses* 48 (Suppl. 2): 8.
- OHST, T., J. PLÖTNER, F. MUTSCHMANN & Y. GRÄSER (2006): Chytridiomykose - eine Infektionskrankheit als Ursache des globalen Amphibiensterbens? *Z. Feldherpetol.* 13: 149-163.
- ONYABE, D. Y. & J. E. CONN (1999): Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Insect Mol. Biol.* 8 (4): 435-442.
- OTHA, T. & G. A. DOVER (1984): The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics* 108: 501-521.
- OUELLET, M., I. MIKAELIAN, B. D. PAULI, J. RODRIGUE & D. M. GREEN (2005): Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conserv. Biol.* 19 (5): 1431-1440.

- PAGANO, A., A. DUBOIS, D. LESBARRÈRES & T. LODÉ (2003): Frog alien species: a way for genetic invasion? *C. R. Biologies* 326: 85-92.
- PAGANO, A., T. LODÉ & P. A. CROCHET (2001): New contact zone and assemblages among water frogs of southern France. *J. Zool. Syst. Evol. Research* 39: 63-67.
- PAGANO, A. & P. JOLY (1999): Limits of the morphometric method for field identification of water frogs. *Alytes* 16: 130-138.
- PAGANO, A., P. JOLY & H. HOTZ (1997): Taxon composition and genetic variation of water frogs in the Mid-Rhône floodplain. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences* 320: 759-766.
- PAGANO, A., P. A. CROCHET, J.-D. GRAF, P. JOLY & T. LODÉ (2001): Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 10: 433-441.
- PARRIS, M. J. (2004): Hybrid response to pathogen infection in interspecific crosses between two amphibian species (Anura: Ranidae). *Evol. Ecol. Res.* 6: 457-471.
- PLÖTNER, J. (1998): Genetic diversity in mitochondrial 12S rDNA of western Palearctic water frogs (Anura, Ranidae) and implications for their systematics. *J. Zoo. Syst. Evol. Research* 36: 191-201.
- PLÖTNER, J. (2005): Die westpaläarktischen Wasserfrösche. Beiheft der Zeitschrift für Feldherpetologie 9. Laurenti-Verlag, Bielefeld. 160 pp.
- PLÖTNER, J., P. BEERLI, T. UZZELL, C. SPOLSKY, T. OHST, S. N. LITVINCHUK, G.-D. GUERX, H.-U. REYER & H. HOTZ (2008): Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs. *J. Evol. Biol.* Im Druck.
- PLÖTNER, J. & M. KLINKHARDT (1992): Investigations on the genetic structure and morphometry of a pure hybrid population of *Rana kl. esculenta* (Anura, Ranidae) in North Germany. *Zool. Anz.* 229: 163-184.
- PLÖTNER, J. & T. OHST (2001): New hypotheses on the systematics of the western Palearctic water frog complex (Anura, Ranidae). *Mitt. Mus. Nat.kd. Berl., Zool. Reihe, Berlin* 77 (1): 5-22.
- PLÖTNER, J., T. OHST, W. BÖHME & R. SCHREIBER (2001): Divergence in mitochondrial DNA of Near Eastern water frogs with special reference to the systematic status of Cypriote and Anatolian populations (Anura, Ranidae). *Amphibia-Reptilia* 22: 397-412.
- POLANCO, C., A. I. GONZÁLEZ, Á. DE LA FUENTE & G. A. DOVER (1998): Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions: a possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics* 149: 243-256.
- POSADA, D. & K. A. CRANDALL (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- POSCHADEL, J. R. & J. PARZEFALL (2003): Molekulargenetik im Artenschutz: Schutz der Europäischen Sumpfschildkröte. *Biol. Unserer Zeit* 33 (3): 148-154.
- PRÜSER, F. (1996): Variabilität mitochondrialer DNA-Sequenzen und die Phylogenie der Gattung *Carabus* Linne, 1758 (Coleoptera: Carabidae). Dissertation, Universität Bremen.
- RAYMOND M. & F. ROUSSET (1995): GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- REICHHOLF, J. H. (1996): Wie problematisch sind Neozoen wirklich? In: Gebhardt, H., R. Kinzelbach & S. Schmidt-Fischer [Hrsg.]: Gebietsfremde Tierarten. Ecomed Verlagsgesellschaft. Landsberg. 314 pp.
- RETALLICK, R. W. R., H. MCCALLUM & R. SPEARE (2004): Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *Public Library of Science (PLOS) Biology* 2 (11): e351.
- RHYMER, J. M. & D. SIMBERLOFF (1996): Extinction by hybridisation and introgression. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 27: 83-109.
- ROWE, G. & T. J. C. BEEBEE (2001): Fitness and microsatellite diversity estimates were not correlated in two outbred anuran populations. *Heredity* 87: 558-565.
- RYBACKI, M. (1994): Water frogs (*Rana esculenta* complex) of the Bornholm island (Denmark). *Zool. Pol.* 39 (3-4): 331-344.
- RYKENA, S. (1988): Innerartliche Differenzen bei der Eizeitigungsdauer von *Lacerta agilis*.- In: Glandt, D. & W. Bischoff (Hrsg.): Biologie und Schutz der Zauneidechse. *Mertensiella* 1: 41-53.
- SAGE, R. D., D. HEYNEMAN, K.-C. LIM & A. C. WILSON (1986): Wormy mice in a hybrid zone. *Nature* 324: 60-63.

- SAKAI, A. K., F. W. ALLENDORF, S. J. HOLT, D. M. LODGE, J. MOLOFSKY, K. A. WITH, S. BAUGHMAN, R. J. CABIN, J. E. COHEN, N. C. ELLSTRAND, D. E. MCCAULEY, P. O'NEIL, I. M. PARKER, J. N. THOMPSON & S. G. WELLER (2001): The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32 (1): 305-332.
- SANGER, F., S. NICKLEN & A. R. COULON (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SANTUCCI, F., G. NASCETTI & L. BULLINI (1996): Hybrid zones between two genetically differentiated forms of the pond frog, *Rana lessonae* in southern Italy. *J. Evol. Biol.* 9: 429-450.
- SCHMELLER, D. (1999): Hemiklonale Vererbung im hybridogenetischen *R. grafi*-Komplex (Anura; Ranidae). Dissertation Universität Mainz.
- SCHMELLER, D. S., A. PAGANO, S. PLÉNET & M. VEITH (2007): Introduced water frogs - Is there a risk for indigenous species in France? *C. R. Biologies* 330: 684-690.
- SCHMIDT, G. & R. PROESS (2003): Grünfrösche. In: Proess (Hrsg.): Verbreitungsatlas der Amphibien des Großherzogtums Luxemburg. *Ferrantia* 37: 68-74.
- SCHNEEWEISS, N. (1997): Fang, Handel und Aussetzung – historische und aktuelle Aspekte des Rückgangs der Europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis* LINNAEUS, 1758) in Brandenburg. *Natursch. u. Landschaftspfl. Bbg.*; Heft 3/1997: 76-81.
- SCHNEEWEISS, N., J. PLÖTNER & H.-K. NETTMANN (2003): *Emys orbicularis* - Artenschutz in der Diskussion. Die Authentizität der autochthonen Populationen erhalten. *Biol. Unserer Zeit* 33 (6): 375-377.
- SCHNEIDER, H. & G. JOERMANN (1988): Mating calls of water frogs (Ranidae) of Lake Scutari, Yugoslavia, and relationship to water frogs of other regions. *Z. zool. Syst. Evol.-forsch.* 26: 261-275.
- SCHRÖER, T. (1997): Untersuchungen zur Populationsgenetik und Ökologie westfälischer Wasserfrösche (Anura: Ranidae). Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- SCHULTZE, J., S. MAISEL, D. GERLACH, T. MÜLLER & M. WOLF (2005): A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 throughout the Eukaryota. *RNA* 11: 361-364.
- SIMONCELLI, F., A. FAGOTTI, R. DALL'OLIO, D. VAGNETTI, R. PASCOLINI & I. DI ROSA (2005): Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in water frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. *EcoHealth* 2: 307-321.
- SINSCH, U. (1998): Biologie und Ökologie der Kreuzkröte. Laurenti-Verlag, Bielefeld. 222 pp.
- SJÖRGEN, P. (1991): Genetic variation in relation to demography of peripheral pool frog populations (*Rana lessonae*). *Evol. Ecol.* 5: 248-271.
- SMITH, J. & P. MODRICH (1997): Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6847-6850.
- SNELL, C., J. TETTEH & I. H. EVANS (2005): Phylogeography of the pool frog (*Rana lessonae* Camerano) in Europe: evidence for native status in Great Britain and for an unusual postglacial colonization route. *Biol. J. Linn. Soc.* 85: 41-51.
- SOWIG, P., J. PLÖTNER & K. FRITZ (2007): Seefrosch *Rana ridibunda* Pallas, 1771. In: Laufer, H., K. Fritz & P. Sowig: Die Amphibien und Reptilien Baden-Württembergs. Ulmer-Verlag, Stuttgart. 650 pp.
- SPENCER, C. C., J. E. NEIGEL & P. L. LEBERG (2000): Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Mol. Ecol.* 9: 1517-1528.
- SPOLSKY, C. & T. UZZELL (1984): Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5802-5805.
- STOCKWELL, C. A., M. MULVEY & G. L. VINYARD (1996): Translocation and preservation of allelic diversity. *Conserv. Biol.* 10 (4): 1133-1141.
- STREIT, B. (1991): Verschleppung, Verfrachtung und Einwanderung von Tieren aus der Sicht des wissenschaftlichen Naturschutzes. In: Hennle, K. & G. Kaule: Arten- und Biotopschutzforschung für Deutschland. Forschungszentrum Jülich, Jülich. 435 pp.
- SUMIDA, M., Y. KATO & A. KURABAYASHI (2004): Sequencing and analysis of the internal transcribed spacers (ITs) and coding regions in the EcoR I fragment of the ribosomal DNA of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. *Genes Genet. Syst.* 79 (2): 105-118.
- SUMIDA, M., M. OGATA & M. NISHIOKA (2000): Molecular phylogenetic relationship of Pond Frogs distributed in the Palearctic region inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S ribosomal RNA and cytochrom b genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16 (2): 278-285.
- SWOFFORD, D. L. (2003): Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

- TABERLET, P., L. FUMAGALLI, A.-G. WUST-SAUCY & J.-F. COSSON (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* 7: 453-464.
- TERHIVUO, J. (1981): Provisional atlas and population status of the Finish amphibian and reptile species with reference to their ranges in northern Europe. *Ann. Zool. Fenn.* 18: 139-164.
- THIESMEIER, B., O. JÄGER & U. FRITZ (1994): Erfolgreiche Reproduktion des Ochsenfrosches (*Rana catesbeiana*) im nördlichen Landkreis Böblingen (Baden-Württemberg). *Z. Feldherpetol.* 1: 169-176.
- THURN, V., A. P. BLOCK & M. HENNECKE (1984): Amphibien und Reptilien im Rems-Murr-Kreis. *Jh. Ges. Naturkde. Württ.* 139: 161-193.
- TREPL, L. & H. SUKOPP (1993): Zur Bedeutung der Introduktion und Naturalisation von Pflanzen und Tieren für die Zukunft der Artenvielfalt. - Dynamik von Flora und Fauna - Artenvielfalt und ihre Erhaltung. Rundgespräche der Kommission für Ökologie, Band 6: 127-142.
- TRYJANOWSKI, P., M. RYBACKI & T. SPARKS (2003): Changes in the first spawning dates of common frogs and common toads in western Poland in 1978-2002. *Ann. Zool. Fenn.* 40: 459-464.
- TSUTSUI, N. D., A. V. SUAREZ, D. A. HOLWAY & T. J. CASE (2000): Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (11): 5948-53.
- TUNNER, H. G. (1973): Das Albumin und andere Bluteiweiße bei *Rana ridibunda* Pallas, *Rana lessonae* Camarano, *Rana esculenta* Linne und deren Hybriden. *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.* 11: 219-233.
- TUNNER, H. G. & H. NOPP (1979): Heterosis in the common european water frog. *Naturwissenschaften* 66: 268-269.
- UZZELL, T. (1982): Immunological relationship of western Palearctic water frogs (Salientia: Ranidae). *Amphibia-Reptilia* 3: 135-143.
- UZZELL, T. & H. HOTZ (1979): Electrophoretic and morphological evidence for two forms of green frogs (*Rana esculenta* complex) in peninsular Italy (Amphibia, Salientia). *Mitt. Zool. Mus. Berlin* 55: 13-27.
- VEITH, M., J. KOSUCH & M. VENCES (2003): Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Ranidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 310-327.
- VIGUERA, E., D. CANCEILL & S. D. EHRLICH (2001): Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J.* 20 (10): 2587-2595.
- VITOUSEK, P. M., C. M. D'ANTONIO, L. L. LOOPE, M. REJMANEK & R. WESTBROOKS (1997): Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zeal. J. Ecol.* 21 (1): 1-16.
- VOITURON, Y., P. JOLY, M. EUGÈNE & H. BARRÈ (2005): Freezing tolerance of the European water frogs: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R1563-R1570.
- VORBURGER, C. (2001): Fixation of deleterious mutations in clonal lineages: evidence from hybridogenetic frogs. *Evolution* 55 (11): 2319-2332.
- VORBURGER, C. & H.-U. REYER (2003): A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs? *Conserv. Genet.* 4: 141-155.
- VORONOV, A. S., D. V. SHIBALEV, A. P. RYSKOV & N. S. KUPRIYANOVA (2006): Evolutionary divergence of ribosomal internal transcribed spacer 2 in Lizards. *Mol. Biol.* 40 (1): 37-42.
- WÄGELE, J. W. (2000): Grundlagen der Phylogenetischen Systematik. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München. 320 pp.
- WALTON, C., J. M. HANDLEY, C. KUVANGKADILOK, F. H. COLLINS, R. E. HARBACH, V. BAIMAI & R. K. BUTLIN (1999): Identification of five species of *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. *Med. Vet. Entomol.* 13: 24-32.
- WELDON, C., L. H. DU PREEZ, A. D. HYATT, R. MULLER & R. SPEARE (2004): Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerg. Infect. Dis.* 10 (12): 2100-2105.
- WITTENBERG, R. (Hrsg.) (2005): An inventory of alien species and their threat to biodiversity and economy in Switzerland. CABI Bioscience Switzerland Centre report to the Swiss Agency for Environment, Forests and Landscape. 416 pp.
- WONG, A. & T. BEEBEE (1994): Identification of a unicellular, non-pigmented alga that mediates growth inhibition in anuran tadpoles: a new species of the genus *Prototheca* (Chlorophyceae: Chlorococcales). *Hydrobiologia* 277: 85-96.
- WYCHERLEY, J., S. DORAN & T. C. J. BEEBEE (2003): Tracing aliens: identification of introduced water frogs in Britain by male advertisement call characteristics. *Herpetol. J.* (13): 43-50.

- WYCHERLEY, J. & T. C. J. BEEBEE (2003): Preliminary investigation of a one-hundred-year-old population of introduced water frogs in Britain. *Herpetol. Bull.* 84: 21-29.
- ZEISSET, I. & T. J. C. BEEBEE (2001): Determination of biogeographical range: an application of molecular phylogeography to the European pool frog *Rana lessonae*. *Proc. R. Soc. Lond.* 268: 933-938.
- ZEISSET, I. & T. J. C. BEEBEE (2003): Population genetics of a successful invader: the marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. *Mol. Ecol.* 12: 639-646.
- ZENGER, K. R., B. J. RICHARDSON & A.-M. VACHOT-GRIFFIN (2003): A rapid population expansion retains genetic diversity within European rabbits in Australia. *Mol. Ecol.* 12: 789-79.
- ZUCKER, M., D. H. MATHEWS & D. H. TURNER (1999): Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. In: Barciszewski, J. & B. F. C. Clark: RNA Biochemistry and Biotechnology. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. 370 pp.

ANHANG 1: Liste aller untersuchten Proben und der bestimmten Genotypen.

Die Proben sind nach den Nummern der Fundorte geordnet.

In der Liste verwendete Abkürzungen. Für Länderkürzel siehe Abkürzungsverzeichnis (S. 95).

PT	Phänotyp	sonstige	
B	<i>R. bergeri</i>	HT	Haplotyp (mt-Genotyp)
BE	<i>R. bedriagae</i>	E	östliche Länge
C	<i>R. ceregensis</i>	N	nördliche Breite
CR	<i>R. cretensis</i>	<	verkürzte Sequenz
E	<i>R. esculenta</i>	hetero	heterozygot
EP	<i>R. epeirotica</i>	A1 / 2	ITS2-Allele 1 / 2
G	<i>R. grafi</i>	Gt	Gewässertyp
H	<i>R. hispanica</i>	Bach	Breite 1-3m
L	<i>R. lessonae</i>	kleiner Fluss	Breite 3-10m
P	<i>R. perezi</i>	großer Fluss	Breite ab 10m
R	<i>R. ridibunda</i>	Teich	künstliches Gewässer mit Wasserstandsregulierungen
S	<i>R. shqiperica</i>	Weiher	kleiner See ohne Tiefenschicht
SA	<i>R. saharica</i>	See	natürliches Stillgewässer
		kleine Aue	flacher, strömungsberuhigter Uferabschnitt mit Vegetation
		Aue	Niederung entlang von Flüssen mit permanentem Wasseraustausch, wechselnde Wasserstände

Proben 1 - 69

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
1	1] Flüren / Bislich	RP 158		less-1	L2	L1	36		RP 193		rid-5b	R1	R1
2	Rheinnebenengewässer	RP 159		less-1	L2	L1	37		RP 194		rid-1	L2	RC3
3	N 5167; E 6.52	RP 160		-	L2	L2	38		RP 195		rid-1	R2	RC2
4	Gt: Weiher (Bild)	RP 161		less-1	L2	L2	39		RP 196		-	RC3	RC3
5		RP 162		less-1	L2	L1	40		RP 197		rid-9b	R2	RC3
6		RP 163		less-1	L2	L1	41		RP 198		rid-9b	R1	RC3
7		RP 164		less-3	L2	L1	42	6] Kemnader See	RP 176		rid-1	R1	R1
8	2] Leygraben	RP 165		less-1	L2	L1	43	(Nordufer)	RP 177		rid-1	-	-
9	bei Flürener Altrhein	RP 166		less-1	L1	L1	44	N 5142; E 7.25	RP 178		rid-1	R2	R2
10	N 5168; E 6.57	RP 167		less-1	L2	L2	45	Gt: See	RP 179		rid-6b	R1	L2
11	Gt: Bach	RP 168		less-1	L2	L2	46		RP 180		rid-1	R2	R2
12		RP 169		less-3	L2	L2	47		RP 181		rid-1	R1	R2
13	3] Aue bei Winz-Hattingen	RP 205		rid-5b	L2	L2	48		RP 182		rid-1	R1	R2
14	N 5140; E 7.15	RP 206		rid-5b	RC3	RC3	49		RP 183		rid-1	R1	R1
15	Gt: Aue	RP 207		rid-9b	R2	R2	50		RP 184		rid-9b	R2	R2
16		RP 208		rid-9b	-	-	51		RP 185		rid-1	R1	R2
17		RP 209		rid-5b	-	-	52	7] Lottental	RP 170		rid-9b	L2	L2
18		RP 210		rid-9b	R1	RC3	53	N 5144; E 7.27	RP 171		rid-9b	L2	L2
19		RP 211		rid-5b	-	-	54	Gt: Kleiner Fluss	RP 172		rid-10b	L2	L2
20		RP 212		rid-5b	R1	RC3	55		RP 173		rid-10b	R2	R2
21		RP 213		less-1	-	-	56		RP 174		rid-9b	L2	L2
22		RP 214		rid-5b	R2	L2	57		RP 175		rid-9b	L2	L2
23	4] Aue bei Witten	RP 199		rid-6b	R1	L2	58	8] Koblenz / Mosel	RP 182		rid-1	R1	R1
24	südöstl. Bommern	RP 200		rid-9b	R2	R2	59	50.31; E 7.46 / Gt: Aue					
25	N 5142; E 7.35	RP 201		rid-6b	R1	R2	59	9] Winnigen/Dieblach	RP 115		rid-1	R1	R3
26	Gt: Aue	RP 202		rid-9b	R2	R2	60	Mosel	RP 116		rid-1	R1	R2
27		RP 203		rid-6b	R1	R1	61	N 50.31; E 7.51	RP 117		rid-1	R2	R3
28		RP 204		less-1	R1	R1	62	Gt: Aue	RP 118		rid-1	R2	R2
29	5] Heisinger Aue	RP 186		rid-1	RC2	RC2	63		RP 119		rid-1	R1	R3
30	N 5142; E 7.07	RP 187		rid-1	RC3	RC1	64		RP 120		rid-1	R1	R3
31	Gt: Aue (Bild)	RP 188		rid-1	R1	RC3	65		RP 121		rid-1	R2	R3
32		RP 189		rid-1	R1	RC2	66		RP 122		rid-1	R1	R2
33		RP 190		rid-1	L2	L2	67		RP 123		rid-1	R2	R3
34		RP 191		rid-1	R1	R2	68		RP 124		rid-1	R1	R3
35		RP 192		rid-1	L2	L2	69		RP 125		rid-1	R1	R2

ANHANG 1 – Fortsetzung, Proben 70 - 192

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
70		RP 126		rid-1	R2	R2	135		RP 81		less-1	L2	L2
71		RP 127		rid-1	R1	R1	136		RP 82		berg-1	L2	L2
72		RP 128		rid-1	R1	R2	137		RP 83		less-1	R3	L2
73		RP 129		rid-1	R1	R2	138		RP 84		berg-1	L2	L2
74		RP 130		rid-1	R2	R2	139		RP 85		berg-1	L2	L2
75		RP 131		rid-1	R2	R3	140	16] Hamm / Rhein	RP 59		berg-1	L2	L2
76	10] Pünderich / Mosel	RP 133		rid-1	R2	R2	141	bei Gernsheim	RP 60		berg-1	L2	L2
77	N 50.04; E 7.14	RP 134		rid-1	R1	R5	142	N 49.73; E 8.42	RP 61		-	R3	L2
78	Gt: Aue (Bild)	RP 135		rid-1	R1	R1	143	Gt: Weiher	RP 62		berg-1	R3	L2
79		RP 136		rid-1	R1/R2	L2	144		RP 63		berg-1	L2	L2
80		RP 137		rid-1	R1	R1	145		RP 64		berg-1	L2	L2
81		RP 138		rid-1	R1	R2	146		RP 65		-	R3	L2
82		RP 139		rid-1	R1	R7	147		RP 66		berg-1	R3	L2
83		RP 140		rid-1	R1	R5	148		RP 67		berg-1	R3	L2
84		RP 141		rid-1	R1	R5	149		RP 68		berg-1	L2	L2
85		RP 142		rid-1	R7	R5	150		RP 69		-	R3	L2
86		RP 143		rid-1	R1	R2	151		RP 70		berg-1	R3	L2
87	11] Trittenheim	RP 144		rid-1	L1	L1	152		RP 71		berg-1	L2	L2
88	Klüssenrath	RP 145		rid-1	R1	L2	153		RP 72		berg-1	R3	L2
89	Mosel	RP 146		cf. rid-6	R7	R7	154		RP 73		berg-1	L2	L2
90	N 49.83; E 6.89	RP 147		-	R2	R7	155	17] Altrip / Rhein	RP 44		berg-1	L2	L1
91	Gt: Aue (Bild)	RP 148		rid-1	L1	L1	156	N 49.44; E 8.47	RP 45		berg-1	L3	L3
92		RP 149		less-1	L2	R7	157	Gt: Weiher	RP 46		berg-1	L2	L2
93		RP 150		rid-1	R1	R2	158		RP 47		berg-1	R3	L2
94		RP 151		cf. rid-6	R1	R1	159		RP 48		berg-1	R3	L2
95		RP 152		cf. rid-6	R1	R7	160		RP 49		berg-1	L3	L2
96		RP 153		cf. rid-6	L1	L1	161		RP 50		berg-1	L2	L2
97	12] Kenn / Mosel	RP 154		rid-1	R7	R7	162		RP 51		berg-1	R3	L3
98	N 49.80; E 6.69	RP 155		rid-1	R2	R7	163		RP 52		berg-1	L2	L2
99	Gt: Weiher	RP 156		rid-1	R2	R7	164		RP 53		berg-1	L3	L2
100		RP 157		rid-1	R1	R2	165		RP 54		berg-1	L2	L2
101	13] Bingen / Rhein	RP 86		rid-1	R2	R2	166		RP 55		berg-1	R3	L2
102	N 49.98; E 7.87	RP 87		rid-1	R2	R3	167		RP 56		-	L2	L2
103	Gt: Aue/Fluss (Bild)	RP 89		rid-1	R1/R2	L2	168		RP 57		berg-1	L2	L2
104		RP 90		rid-4	L2	L2	169		RP 58		-	R3	L2
105		RP 91		rid-1	R3	L2	170	18] Philippsburg	BW11/749	E	-	R3	L2
106		RP 92		rid-1	R2	R2	171	Altrheinarm	BW12/750	E	-	R3	L2
107		RP 93		-	L2	L2	172	N 49.24; E 8.44	BW13/751	E	berg-1	L2	L2
108		RP 94		rid-1	R3	L2	173	Gt: Aue / Altarm (Bild)	BW14/752	E	berg-1	R3	L2
109		RP 95		rid-1	RC1	RC1	174		BW15/753	E	berg-1	R3	L2
110		RP 96		rid-1	R3	L2	175		BW16/754	L	-	L2	L2
111		RP 97		rid-1	R3	L2	176		BW17/755	E	berg-1	L2	L2
112		RP 98		-	R1	RC1	177		BW18/756	E	berg-1	L2	L2
113		RP 99		rid-1	R3	L2	178		BW19/757	E	berg-1	R3	L2
114		RP 100		rid-1	L2	L2	179		BW20/758	E	-	L2	L2
115	14] Ingelheim / Rhein	RP 101		rid-1	L5	L5	180	19] Rheinsheim / Rhein	BW21/759		berg-1	L2	L2
116	N 49.98; E 8.00	RP 102		rid-13b	R1	L2	181	N 49.23; E 8.4	BW22/760		berg-1	L2	L2
117	Gt: Aue / Weiher	RP 103		rid-1	R2	R7	182	Gt: Weiher (Bild)	BW23/761		berg-1	L2	L2
118		RP 109		rid-1	R1	L2	183		BW24/762		berg-1	L2	L2
119		RP 110		rid-1	L2	L2	184		BW25/763		berg-1	R3	L2
120		RP 111		rid-3	R2	L2	185		BW26/764		berg-1	R3	L2
121		RP 112		rid-1	L2	L2	186		BW27/765		berg-1	L2	L2
122		RP 113		rid-1	L2	L2	187		BW28/766		berg-1	R3	L2
123		RP 114		rid-1	L2	L2	188		BW29/767		berg-1	L2	L2
124	15] Guntersblum / Rhein	RP 75		berg-1	L2	L2	189		BW32		berg-1	R3	L2
125	bei Oppenheim	RP 76		less-1	L2	L2	190	20] Rußheim/Dettenheim	BW31		berg-1	L2	L2
126	N 48.80; E 8.38	RP 77		berg-1	L3	L2		N 49.19; E 8.46					
127	Gt: Weiher	RP 78		berg-1	R3	L2		Gt: Baggersee					
128		RP 79		berg-1	L2	L2	191	21] Speyer / Rhein	RP 36		berg-1	L2	L2
129		RP 80		berg-1	L2	L2	192	N 49.34; E 8.47	RP 37		berg-1	L2	L2

ANHANG 1 – Fortsetzung, Proben 193 - 310

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
193	Gt: Aue	RP 38		berg-1	L2	L2	253		BW44/780	E	berg-1	L2	L2
194		RP 39		berg-1	L2	L2	254		BW45/781		berg-1	L3	L2
195		RP 40		berg-1	L2	L2	255		BW46/782		berg-1	L3	L2
196		RP 41		berg-1	L2	L2	256		BW47/783		berg-1	L3	L2
197		RP 42		berg-1	L2	L2	257	28] Lichtenau	BW48/784	E	berg-1	L2	L2
198		RP 43		rid-1	L2	L2	258	Helmlingen	BW49/785	E	berg-1	L2	L2
199	22] Wörth	RP 44		berg-1	R3	L2	259	Rhein	BW50/786	E	berg-1	L2	L2
200	N 49.07; E 8.32	RP 45		berg-1	R3	L2	260	N 48.70; E 7.95	BW51/787	E	berg-1	L2	L2
201	Gt: Weiher	RP 46		-	R3	L2	261	Gt: Nebenarm / Aue (Bild)	BW52/788	E	berg-1	L2	L2
202		RP 47		berg-1	R3	L2	262		BW53/789	E	berg-1	L2	L2
203		RP 48		berg-1	R3	L2	263		BW54/790		berg-1	L2	L2
204		RP 49		berg-1	R3	L2	264		BW55/791		berg-1	L3	L2
205		RP 20		berg-1	R3	L2	265		BW56/792	E	berg-1	L2	L2
206		RP 21		berg-1	R3	L1	266		BW57		rid-1	L3	L2
207		RP 22		berg-1	R3	L2	267	29] Ettenheim	BW173/831		rid-5b	R1	L4
208		RP 23		berg-1	R3	L2	268	Fischzuchtanlage	BW174/832	R	rid-9b	L4	L4
209		RP 24		berg-1	R3	L2	269	N 48.27; E 7.87	BW175/833	R	rid-5b	R6	RC4
210	23] Ludwigsau / Rhein	RP 1		berg-1	L2	L2	270	Gt: Teich	BW176/834	R	rid-5b	R6	RC4
211	N 49.02; E 8.28	RP 2		berg-1	L2	L2	271		BW177/835	R	rid-9b	R2	R6
212	Gt: Aue	RP 3		berg-1	R3	L2	272		BW178/836	R	rid-9b	R1	L4
213		RP 4		berg-1	L2	L2	273		BW179/837	R	rid-1	R1	R6
214		RP 5		berg-1	L2	L2	274		BW180/838	R?	rid-9b	L4	L2
215		RP 6		berg-1	L2	L2	275		BW181/839	R	rid-9b	R1	R1
216		RP 7		berg-1	L2	L2	276		BW182/840	R/E	rid-10b	L2	L2
217		RP 8		berg-1	L2	L2	277		BW183/841		rid-9b	L4	L4
218		RP 9		berg-1	L2	L2	278		BW184/842	R?	rid-1	hetero	-
219		RP 10		berg-1	L3	L2	279		BW185/843	E?	rid-9b	L2	L2
220		RP 11		berg-1	L2	L2	280		BW186/844		rid-9b	R1	RC4
221		RP 12		berg-1	R3	L2	281	30] Leopoldskanal	BW 215		rid-1	R2	RG2<
222		RP 13		berg-1	L3	L2	282	bei Weisweil	BW 216		rid-1	L2	R6
223	24] Neuenstadt	BW 1		rid-1	R3	R1/R2	283	N 48.20; E 7.68	BW 217		rid-1	RG2<	RG2<
224	Kocherturm	BW 2		rid-1	R1/R2	R3	284	Gt: See	BW 218		rid-1	R6	L2
225	Kocher	BW 3		rid-6b	R1	R3	285	31] Jechtingen/Sasbach	BW 58		rid-1	L4	L4
226	N 49.24; E 09.3	BW 5		rid-1	R1	L2		Rhein N 48.13; E 7.6					
227	Gt: kleine Aue	BW 6		rid-1	R2	R2		Gt: Weiher					
228		BW 7		rid-6b	R2	R3	286	32] Jechtingen	BW 59		cf.rid-3	R1	R1
229	25] Neuenstadt/Gochsen	BW8/746	R	rid-6b	R1	R1	287	Altrheinarm	BW 60		rid-1	R2	R2
230	N 49.23; E 09.37	BW9/747	E	rid-6b	R3	L2	288	N 48.12; E 7.58	BW 61		cf.rid-3	R2	L4
231	Kocher / Gt: Fluss / Aue	BW 10/748	R	rid-6b	R1	R1	289	Gt: Aue (Bild)	BW 62		cf.rid-3	R1	R2
232	26] Eggenstein	RP 26		berg-1	R3	L2	290		BW 63		rid-1	R2	L2
233	-Leopoldshafen	RP 27		berg-1	L2	L2	291		BW 64		rid-1	L4	L4
234	Rhein	RP 28		berg-1	R1/R2	L1	292		BW 65		rid-1	R1	R1
235	N 49.11; E 8.37	RP 29		berg-1	L2	L2	293		BW 66		cf.rid-3	R1	R1
236	Gt: Aue	RP 30		berg-1	L2	L2	294		BW 67		rid-1	R1	L4
237		RP 31		berg-1	L2	L2	295		BW 68		cf.rid-3	R2	R2
238		RP 32		berg-1	L2	L2	296		BW 69		rid-1	R1	L2
239		RP 33		berg-1	L2	L2	297		BW 70		rid-10b	R2	R2
240		RP 34		berg-1	L2	L2	298		BW 71		rid-1	R4	RG2<
241		RP 35		berg-1	L2	L2	299		BW 271		rid-1	R1	R2
242	27] Rheinmünster	BW33/769		berg-1	L2	L2	300	33] Breisach/Lohmühle	BW 72		rid-1	L2	L4
243	Söllingen	BW34/770	L?	berg-1	L2	L2	301	Rhein	BW 73		rid-1	R1	L2
244	Rhein	BW35/771		berg-1	L3	L2	302	N 48.05; E 7.58	BW 74		rid-1	L4	RG2<
245	N 48.78; E 8.03	BW36/772		berg-1	L2	L2	303	Gt: Aue (Bild)	BW 75		rid-1	R1	L2
246	Gt: Bach	BW37/773		berg-1	L2	L2	304		BW 76		rid-1	R1	R1
247		BW38/774		berg-1	L2	L2	305		BW 77		rid-1	L2	L2
248		BW39/775		berg-1	L2	L2	306		BW 78		rid-1	R1	R2
249		BW40/776		berg-1	L2	L2	307		BW 79		rid-1	R1	L4
250		BW41/777		berg-1	L2	L2	308		BW 80		rid-1	R1	R1
251		BW42/778		berg-1	L3	L2	309		BW 81		rid-1	R1	R4
252		BW43/779	E	-	L3	L2	310		BW 82		rid-1	R1	L2

ANHANG 1 – Fortsetzung, Proben 311 - 425

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
311		BW 83		berg-1	L2	L2	367	40] Waldshut / Tiengen	BW127/795		rid-10b	R1	R1
312	34] Hartheim / Rhein	BW 85		rid-1	R2	R2	368	Rhein	BW128/796		rid-10b	L4	L4
313	N 47.93; E 7.6	BW 86		rid-1	R1	RG2<	369	N 47.62; E 8.25	BW129/797		rid-10b	R1	R1
314	Gt: kleine Aue (Bild)	BW 87		rid-1	R1	R4	370	Gt: kleiner Nebenarm (Bild)	BW130/798		rid-10b	-	-
315		BW 88		rid-1	R1	L2	371		BW131/799		rid-10b	R1	L4
316		BW 89		rid-1	R1	RG2<	372		BW132/800		rid-10b	R1	-
317		BW 90		cf. rid-3	R1	R2	373		BW133/801		rid-10b	L4	-
318		BW 91		rid-7b	R1	R1	374		BW134/802		rid-7b	R1	R1
319		BW 92		rid-1	R1	R2	375		BW135/803		rid-10b	hetero	-
320		BW 93		rid-1	L2	L2	376		BW136/804		rid-10b	R1	R1
321		BW 94		rid-7b	L2	L2	377		BW136/805		rid-10b	R1	R1
322		BW 95		cf. rid-3	R2	R2	378	41] Lienheim	BW137/806		rid-1	R1	R2
323		BW 96		rid-1	R1	RG2<	379	Rhein N 47.57; E 8.42	BW138/807		rid-7b	R2	L2
324		BW 296		cf. rid-3	R1	R2		Gt: kleine Aue					
325	35] Bremgarten/Grißheim	BW 108		cf. rid-3	R1	R2	380	42] Eriskirch	BW150/808		berg-1	L2	L2
326	Rhein	BW 109		rid-1	R1	L2	381	Schussen/Bodensee	BW151/809	E/L	berg-1	L2	L2
327	N 47.9; E 7.58	BW 110		rid-7b	R1/R2	L4	382	N 47.62; E 9.53	BW152/810	E	berg-1	L2	L2
328	Gt: kleine Aue	BW 111		rid-1	L4	L4	383	Gt: Weiher	BW153/811	E	berg-1	L3	L2
329		BW 112		rid-1	R1	RG2<	384		BW154/812	E	berg-1	L2	L2
330		BW 113		rid-1	L2	L2	385		BW155/813	E	berg-1	L3	L2
331		BW 114		rid-1	L4	L4	386		BW156/814	E	berg-1	L2	L2
332		BW 115		rid-1	L2	L2	387		BW157/815	E	berg-1	R1	L2
333		BW 116		rid-1	L2	L2	388		BW158/816	E	berg-1	L2	L2
334		BW 117		rid-1	L2	L2	389		BW159/817	E	berg-1	L2	L2
335		BW 118		rid-1	R4	L2	390	43] Dellemsingen / Ulm	BW 143		less-1	L2	L2
336		BW 119		rid-1	R1	R4	391	N 48.30; E 9.87	BW 144		less-1	L2	L2
337		BW 121		rid-1	L2	L2	392	Gt: See	BW 145		less-1	R1	L2
338		BW 120		rid-1	L2	RG2<	393		BW 146		rid-10b	L2	L2
339		BW 122		rid-1	R2	L2	394		BW 147		less-1	R1	L2
340		BW 123		cf. rid-3	R2	R2	395		BW 148		less-1	R1	L2
341		BW 124		rid-1	R1	L2	396		BW 149		less-1	R1	L2
342	36] Steinstadt / Rhein	BW 97		rid-1	R1	R4	397	44] Donau-Stetten / Ulm	BW 139		rid-8b	R2	L2
343	N 47.77; E 7.53	BW 98		rid-1	R1	L4	398	N 48.33; E 9.92	BW 140		rid-1	L2	L2
344	Gt: kleine Aue	BW 99		rid-1	R1	R2	399	Gt: See	BW 141		rid-8b	L2	L2
345		BW 100		cf. rid-3	R1	R2	400		BW 142		rid-1	R2	L2
346		BW 101		rid-1	R1	R2	401	45] Niemege (BB)	BW187/845	R	less-2	R1	R1
347		BW 102		rid-1	R1	R4	402	Fischzuchtanlage	BW188/846	R	less-2	R1	L1
348		BW 103		rid-1	-	-	403	N 52.08; E 12.70	BW189/847	E	less-2	R1	L1
349		BW 104		rid-1	R1	R1	404	Gt: Teich	BW190/848	R	-	R1	R1
350		BW 105		rid-1	R1	R2	405		BW191/849	R	-	R1	R2
351		BW 106		rid-1	R1	R2	406		BW192/850	R	less-1	R2	R2
352		BW 107		rid-1	R1	R2	407		BW193/851	R	less-2	R1	R2
353	37] Efringen-Kirchen	BW161/819		rid-7b	hetero	-	408		BW195/853	R	less-1	R1	R9
354	Istein	BW162/820		rid-1	L4	L4	409		BW196/854	R	less-2	R1	R2
355	Rhein	BW163/821		rid-1	RC1	R4	410		BW197/855	R	less-2	R1	R1
356	N 47.65; E 7.53	BW164/822		rid-1	L4	L4	411		BW198/856	R	less-2	R1	R1
357	Gt: kleine Aue	BW165/823		rid-7b	R1	R1	412		BW199/857	R	less-1	R1	R2
358		BW166/824		cf. rid-1	R1/R2	R1/R2	413		BW200/858	R/E	less-2	R1	R1
359		BW167/825		cf. rid-3	L4	L4	414		BW201/859	R/E	less-2	L1	L1
360		BW168/826		rid-1	R1	R1/R2	415		BW202/860	R	less-2	R1	R1
361		BW169/827		rid-1	-	-	416		BW203/861	R	less-2	R1	R9
362		BW170/828		rid-1	-	-	417		BW204/862	R	less-1/2	R1	R1
363		BW171/829		rid-1	R4	RG2<	418		BW205/863	R	less-2	R2	R2
364		BW172/830		cf. rid-3	R1	RC1	419		BW206/864		less-1	R1	R1
365	38] Wehra / Rhein	BW126/794		cf. rid-2	R1	L4	420		BW 207		less-2	R1	R1
	N 47.58; E 7.9						421	46] Amex (CH)	Ar 1	R	rid-1	R2	R2
	Gt: großer Fluss						422	N 46.70 ; E 6.52	Ar 3	R	rid-1	-	-
366	39] Albrück / Laufenberg	BW125/793		rid-7b	L4	L4	423		Ar 4	R	rid-1	-	-
	Rhein N 47.58; E 8.13						424		Ar 5	R	rid-1	R2	R2
	Gt: kleine Aue (Bild)						425		Ar 6	R	rid-1	-	-

ANHANG 1 – Fortsetzung, Proben 426 - 542

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
426	47] Bavois (CH)	Ba 33	R	rid-1	R1	R2	485		2CHO 492	R	cf.rid-7	R2	RC 19
427	N 46.68; E 06.57	Ba 34	R	rid-1	-	-	486		2CHO 493	R	-	R2	R2
428		Ba 35	R	rid-1b	R2	R7	487		2CHO 494	R	-	R2	R5
429		Ba 37	R	rid-1	R2	R4	488		2CHO 507	R	rid-1	-	-
430		Ba 39	R	rid-1	-	-	489		2CHO 535	R	rid-14b	R2	RC 19
431		Ba 40	R	rid-12b	-	-	490		2CHO 536	R	rid-3	R1	R2
432		Ba 41	R	rid-1	-	-	491		3CHO 427	R	rid-10b	R2	L2
433		Ba 47	R	cf.rid-2	-	-	492		3CHO 428	R	-	L2	L4
434		Ba 48	R	rid-1	R2	R7	493		3CHO 429	R	-	R2	R4
435		Ba 49	R	rid-1	R2	R8	494		3CHO 430	R	rid-3	R1	R2
436		Ba 50	R	rid-1	R2	R2	495		3CHO 431	R	-	R2	R4
437		Ba 51	R	rid-1	R2	R8	496		3CHO 432	R	-	R2	R2
438		Ba 56	R	rid-1	R2	R8	497		3CHO 488	R	rid-1	R1	R1
439		Ba 57	R	rid-1	-	-	498		3CHO 489	R	-	R1	R2
440	48] Creux de Terre (CH)	Ch 102	R	rid-1	-	-	499		3CHO 490	R	-	R2	L2
441	Charonay	Ch 103	R	-	R1	R1	500		3CHO 491	R	rid-1	R2	RC 19
442	N 46.72; E 06.57	Ch 101	R	rid-1	R8	R8	501		3CHO 537	R	rid-1	R1	R2
443		Kr 1	R	cf.rid-4	R4	R4	502		3CHO 538	R	cf.rid-7	R2	R2
444		Kr 10	R	cf.rid-4	-	-	503		3CHO 541	R	-	R1	R2
445		Kr 12	R	rid-1	R4	R4	504		3CHO 542	R	cf.rid-7	R2	R5
446		Kr 13	R	cf.rid-4	-	-	505	53] Camargue (F)	CA 126	G	perezi-1	R2	P1
447		Kr 3	R	cf.rid-5	R2	R2	506	N 43.66; E 04.67	CA 127	P	perezi-1	P1	P2
448		Kr 4	R	cf.rid-4	R2	RC 1	507		CA 139	G	perezi-1	R1/R2	P2
449		Kr 5	R	rid-1	-	-	508		CA 141	G	perezi-1	R2	P1
450		Kr 6	R	rid-1	R1	R1	509		CA 142	G	perezi-1	-	-
451		Kr 7	R	rid-10b	-	-	510		CA 143	G	perezi-1	P2	P2
452	49] Penthaz (CH)	Pe 1	R	rid-1	-	-	511		CA 145	G	perezi-1	R2	P2
453	N 46.58; E 06.53	Pe 17	R	rid-1	hetero	-	512		CA 146	R	rid-1	R2	R2
454		Pe 18	R	rid-1	-	-	513		CA 147	R	rid-1	-	-
455	50] Dätwil-Garden (CH)	Hotz 18510	E	-	L7	L7	514		CA 148	G	perezi-1	P2	P2
	N 47.60; E 8.70						515		CA 149	G	perezi-1	P2	P2
456	51] Friedrichshagen (D)	M 15	R	less(12S)	L1	L1	516		CA 144	R	rid-1	R5	R5
457	N 52.27; E 13.38	M 110	R	less(12S)	L1	L1	517	54] Crolles (F)	CR 130	R	rid-1	-	-
458	Gt: Teich	M 16	R	less(12S)	L1	L1	518	N 45.60; E 06.17	CR 190	R	cf.rid-6	R1/R2	R3
459	52] Chautagnes (F)	1CHO 506	R	cf.rid-7	-	-	519		CR 192	R	rid-1	R1/R2	R3
460	N 46.05; E 05.88	1CHO 510	R	rid-1	-	-	520		CR 193	R	cf.rid-6	R2	L2
461		1CHO 511	R	rid-1	-	-	521	55] Doazon (F)	DO 10	-	perezi-2	-	-
462		1CHO 512	R	rid-1	L2	L2	522	N 43.75; E -00.91	DO 17	-	-	R2	R4
463		1CHO 514	R	cf.rid-7	R2	R5	523	56] Delta de la Dranse (F)	DRA 303	R	cf.rid-4	R1	R1
464		1CHO 515	R	rid-3	R2	R3	524	N 46.23; E 06.35	DRA 304	R	rid-1	-	-
465		1CHO 516	R	rid-1	-	-	525		DRA 311	R	rid-1	R1/R2	RC 1
466		1CHO 525	R	cf.rid-7	-	-	526		DRA 313	R	rid-1	-	-
467		1CHO 526	R	cf.rid-7	-	-	527		DRA 314	R	rid-1	-	-
468		1CHO 527	R	cf.rid-7	-	-	528		DRA 315	R	rid-1	-	-
469		1CHO 528	R	rid-1	-	-	529		DRA 316	R	rid-1	R1	R1
470		1CHO 530	R	rid-1	R1	R2	530		DRA 317	R	cf.rid-4	R1	R1
471		1CHO 531	R	cf.rid-8	-	-	531		DRA 318	R	rid-1	R2	R4
472		1CHO 534	R	rid-3	-	-	532		DRA 319	R	rid-1	-	-
473		2CHO 394	R	rid-1	-	-	533		DRA 323	-	-	R1/R2	L3
474		2CHO 395	R	rid-3	-	-	534	57] Etournelles (F)	ETO 222	R	cf.rid-6	R1	R1
475		2CHO 396	R	rid-1	R2	R2	535	N 46.23; E 05.93	ETO 223	R	rid-10b	R1/R2	-
476		2CHO 397	R	rid-1	-	-	536		ETO 224	R	-	R2	R2
477		2CHO 398	R	-	R1	R2	537		ETO 225	R	rid-14b	R1/R2	-
478		2CHO 399	R	rid-14b	-	-	538		ETO 226	R	rid-10b	R2	R2
479		2CHO 419	R	rid-1	R2	R2	539		ETO 236	R	rid-1	R2	-
480		2CHO 420	R	rid-1	R1	R2	540	58] Plaine du Forez (F)	FOR 212	R	-	R1	R3
481		2CHO 421	R	-	RC 19	RC 19		N 45.2; E 4.03					
482		2CHO 422	R	-	R1	L2	541	59] Morte de la Barre (F)	MB 375	R	rid-1	R1	R2
483		2CHO 423	R	rid-3	R2	R2		N 45.93; E 05.6					
484		2CHO 424	R	rid-3	RC 19	RC 19	542	60] Montpellier (F)	MO 131	R	cf.rid-6	-	-

ANHANG 1 – Fortsetzung, Proben 543 - 643

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
543	N 43.72; E 4.1	MO 135	R	cf.rid-6	R2	RC17	598	72] Luckenwalde (D)	ZMB46848	L	less-2	L2	L2
544		MO 137	R	cf.rid-6	RC17	RC17		N 52.08; E 13.17					
545		MO 138	R	cf.rid-6	R2	RC17	599	73] Mühlenbeck (D)	ZMB61136	L	less-1	L2	L2
546	61] Gravillière Platière (F)	PL 153	R	rid-1	R2	RC20	600	N 52.67; E 13.38	ZMB61148	L	less-2	L1	L1
547	N 45.33; E 04.77	PL 154	R	-	RC1	L2	601	74] Suckow (D)	ZMB61731	E	-	L1	-
548		PL 155	R	-	R1	R2		N 53.92; E 13.97					
549		PL 157	R	rid-10b	R2	R2	602	75] Lebus (D)	ZMB60039	E	-	R2	L2
550		PL 158	R	rid-1	R2	R2	603	N 52.42; E 14.53	AO	R	less-1	L1	L1
551		PL 159	R	-	RC1	RC1	604	Gt: Aue	AO	E	less-1	L2	L2
552		PL 160	R	rid-5b	R1	R1	605		AO 1/96	E	less-1	L2	L2
553		PL 161	R	rid-10b	R1	R2	606		AO 10/96	R	-	L2	L2
554		PL 162	R	-	RC1	RC1	607		AO 11/96	E	less-1	L2	L2
555		PL 163	R	cf.rid-6	-	-	608		AO 12/96	E	rid-10b	L2	L2
556		PL 164	R	rid-1b	R1	R2	609		AO 13/96	E	-	L2	L2
557		PLA 320	R	cf.rid-6	R7	RC1	610		AO 2,1/96	R	less-1	L1	L1
558		PLA 321	R	rid-1b	-	-	611		AO 2,3/96	E	less-1	L2	L2
559		PLA 323	R	rid-1	-	-	612		AO 2,9/96	R	less-1	R2	R2
560		PLA 324	R	rid-10b	R1/R2	-	613		AO 3/96	E	less-1	R2	R2
561		PLA 325	R	-	R1/R2	-	614		AO 6/96	E	less-1	L2	L2
562	62] Ramière (F)	RA 165	R	rid-1	R2	R4	615		AO 7/96	E	less-1	L2	L2
563	N 44.77; E 4.85	RA 167	R	rid-1	R1/R2	RC1	616		AO 8/96	E	rid-10b	L2	L2
564		RA 168	R	rid-1	R1/R2	R4	617	76] Sieblebener See (D)	ZMB46258	E	-	L2	L2
565		RA 170	R	rid-1	R4	R5		N 50.95; E 10.75					
566		RA 171	R	rid-10b	-	-	618	77] Skåne (S)	TB44-031	E	less-1	L2	L2
567		RA 172	R	rid-1	-	-	619	N 55.57; E 13.22	TB44-035	E	less-2	L2	L2
568		RA 173	R	rid-1	R2	R3	620	78] Skåne (S)	TB48-032	E	less-2	L1	L1
569		RAM 202	R	rid-1	-	-	621	N 55.37; E 13.1	TB48-081	E	less-1	L1	L2
570		RAM 203	R	rid-1b	R2	R2	622	79] Uppland (S)	hag3:6	L	less-1	L1	L1
571		RAM 204	R	rid-1b	R1	R3		N 60.6; E 17.62					
572		RAM 205	R	rid-10b	-	-	623	80] Uppland (S)	ka11	L	less-1	L2	L2
573		RAM 207	R	rid-1	L1	L1		N 60.43; E 18.08					
574		RAM 208	R	rid-10b	R1/R2	-	624	81] Poznan (PL)	Hotz18:92	R	rid-1	R1	R2
575		RAM 209	R	rid-10b	-	-		N 52.42; E 16.97					
576		RAM 210	R	rid-1	-	-	625	82] Poznan (PL)	Sp.187	L	less-5	L1	L2
577		RAM 211	R	rid-1	R2	R4		N 52.40; E 16.9					
578		RAM 293	R	-	R1	R3	626	83] Harsz (PL)	ZMB53743	E	less-6	L1	L2
579		RAM 295	R	rid-1	-	-	627	N 54.13; E 2178	ZMB56012	E	less-6	-	-
580		RAM 296	R	rid-1b	R2	R2	628	84] Tartu (EW)	Sp.240	E	-	L2	L2
581	63] St Mathieu Tréviers (F)	SMT 297	R	rid-1	R2	R2		N 58.37; E 26.72					
582	N 43.93; E 04.05	SMT 298	G	perezi-1	R2	P1	629	85] Kharkov (UKR)	Sp.264	E	-	L1	L2
583		SMT 299	R	rid-1	R2	R4	630	N 49.47; E 36.87	Sp.265	E	-	L1	L2
584		SMT 300	R	rid-1	R2	R4	631		Sp.318	E	-	L2	L2
585		SMT 301	R	rid-1	R2	R3	632		Sp.317	E	-	L2	R2
586		SMT 305	R	rid-1	-	-	633	86] Chernobyl (UKR)	Sp.93	R	rid-10b	R2	R2
587	64] Sables d'Olonne (F)	SO 128	R	rid-1	R2	R3		N 51.27; E 30.23					
588	N 46.93; E -02.2	SO 129	R	cf.rid-9	R2	R5	634	87] Chernigov (UKR)	Sp.184	L	less-1	L1	L1
589	65] Toulouse (F)	TO 150	R	cf.rid-4	R2	R2		N 51.03; E 31.88					
590	N 43.53; E 0147	TOV 185	R/G	perezi-1	-	-	635	88] St.Petersburg (RUS)	Sp.247	R	-	RC8	RC8
591	66] Aube (F)	AUB 2003		rid-1	R2	R2	636	N 59.88; E 29.9	Sp.248	R	cf.rid-10	hetero	-
	N 49.03; E 6.33						637	89] Kaliningrad (RUS)	Sp.273	R	rid-1	R2	R1
592	67] Narbonne (F)		P	perezi-1	-	-		N 54.63; E 19.87					
	N 43.18; E 03.00						638	90] Moskau (RUS)	Sp.277	R	rid-1	R2	R2
593	68] St Etienne du Gres(F)	St Etienne	R	rid-1	-	-	639	N 54.98; E 39.07	Sp.278	R	less-1	R1	R1
	N 43.78; E 04.72						640		ZMB46428	R	rid-1	-	-
594	69] Teschendorf (D)	(3N)	E	less-2	R2	L1	641	91] Kursk (RUS)	Sp.171	L	less-1	L2	L1
595	N 52.83; E 13.13		L	less-2	L1	L1		N 51.65; E 35.28					
596	70] Kumbach / Gotha(D)	ZMB45988	L	less-2	L2	L2	642	92] Smolensk (RUS)	Sp.304	L	less-1	L2	L2
	N 50.95; E 10.72							N 55.6; E 33.3					
597	71] Wernitz (D)	ZMB45501	L	less-2	L1	L1	643	93] Chuvasl Alaty (RUS)	Sp.295	L	less-4	L2	L1
	N 52.57; E 12.92							N 54.9; E 46.72					

ANHANG 1 – Fortsetzung, Proben 644 - 750

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
644	94] Samara (RUS)	Sp.125	R	cf.rid-4	hetero	-	694	18] Nea Manolada (GR)	Hotz19532	R	rid-5b	-	-
	N 53.17; E 49.45						695	N 37.7; E 214	Hotz19547	EP?	epe-1	EPE1	EPE1
645	95] Ryazan (RUS)	Sp.271	R	rid-1	R2	R2	696		Hotz19548	R	rid-18b	-	-
646	N 54.73; E 39.52	Sp.272	R	rid-1	R2	R2	697	19] Lechena (GR)	Hotz19552	EP	epe-2	-	-
647	96] Aschchabad (TM)	ZMB45494	R	cf.rid-19	RC14	RC14	698	N 37.93; E 2127	Hotz19567	EP	epe-2	-	-
	N 37.95; E 58.38						699		Hotz19568	EP?	epe-1	EPE1	EPE1
648	97] Atyrau (KZ)	Sp.252	R	cf.rid-4	RC7	RC7	700		Hotz19569	R	rid-20b	RC11	RC11
649	N 47.1; E 51.92	Sp.253	R	cf.rid-4	RC7	RC7	701	20] Igouminitsa (GR)	Hotz19421	EP	epe-3	-	-
650		Sp.254	R	cf.rid-4	R2	RC7	702	N 39.5; E 20.27	Hotz19443	EP?	epe-3	EPE2	EPE2
651		Sp.255	R	cf.rid-4	RC7	RC7	703		Hotz19444	EP	epe-3	-	-
652	98] Adyghea (RUS)	Sp.132	R	-	RC7	-	704		J.181/03	EP?	epe-3	EPE2	EPE2
	N 44.62; E 40.02						705	21] Kilinie (GR)	J.412/04	EP?	-	EPE1	EPE1
653	99] Megri (AR)	Sp.309	R	-	hetero	-		N 37.93; E 2115					
654	N 38.9; E 46.25	Sp.310	R	-	hetero	-	706	22] Mistros/Euboia (GR)	Hotz17341	R	rid-10b	-	-
655	100] Aktobe (KZ)	Sp.250	R	cf.rid-4	RC7	RC7	707	N 38.52; E 23.85	Hotz17342	R	rid-15b	RC18	RC18
	N 50.28; E 57.22						708		Hotz17343	R	rid-10b	-	-
656	101] Akcapinar (TR)	J.160/03	R	cf.rid-12	-	-	709	23] Aliartos (GR)	Hotz17357	R	rid-16b	-	-
657	N 37.2; E 32.2	J.161/03	R	cf.rid-12	-	-	710	N 38.37; E 23.1	Hotz17359	R	rid-17b	hetero	-
658		J.165/03	R	cf.rid-12	-	-	711		Hotz17360	R	rid-17b	-	-
659		J.166/03	R	-	R10	R10	712	24] Skala (GR)	Hotz19483	R	rid-5b	-	-
660		J.170/03	R	-	R10	R10	713	N 36.83; E 22.65	Hotz19500	R	rid-5b	RC12	RC12
661		Hotz16808	R	cf.rid-12	-	-	714	25] Kavasilas (GR)	Hotz19510	R	rid-18b	-	-
662	102] Zypern	Hotz19410	BE	cf.rid-16	hetero	-	715	N 37.87; E 2127	Hotz19528	R	rid-19b	hetero	-
663	N (34.92); E (32.87)	Hotz19411	BE	-	411<	411<	716	26] Skinias/Kreta (GR)	J.21/03	CR	cre-1	CRE<	CRE<
664		Hotz19412	BE	-	411<	411<		N 35.06; E 25.31	J.22/03	CR	cre-2	CRE<	CRE<
665		Hotz19413	BE	-	hetero	-	717	27] Vizipar (CG)	ZMB47496	S	shq-1	SHQ<	SHQ<
666		Hotz19416	BE	cf.rid-16	hetero	-		N 42.23; E 19.1					
667	103] Xyliatos See (CY)	Xyliatos11	BE	spec-1	Xyl<	Xyl<	718	28] Donau-Delta (RO)	ZMB47435	R	rid-5b	R2	R2
	N 35.15; E 33.35						719	N 45.03; E 29.17	ZMB47489	E	rid-1	L6	L6
668	104] Cevlik/Antakya (TR)	Sur202	BE	cf.rid-18	-	-	720		ZMB47433	R	rid-1	R2	R2
669	N 36.23; E 36.12	Sur203	BE	cf.rid-18	203<	203<	721		ZMB47441	L	less-6	L2	L1
670	105] Amman (JOR)	ZFMK63535	BE	bed-2	hetero	-	722	29] Donau-Delta (RO)	ZMB47456	L	less-1	L1	L6
	N 31.95; E 35.93						723	Caraoorman N45.08; E29.4	ZMB47460	L	-	L6	L6
671	106] As Suwayda (SYR)	ZFMK64945	BE	bed-1	RC9	RC9	724	30] Carbonara (I)	Italien1	L	less-1	L1	L1
	N 32.72; E 36.55						725	Dolomiten	Italien2	L	less-1	L1	L1
672	107] Abu-Kamal (SYR)	ZFMK61786	BE	cf.rid-15	RC10	RC10	726	N 45.93; E 1122	Italien3	L	less-1	-	-
	N 34.43; E 40.93						727	31] Casamozza/Korsika	899/01T3	B	berg-1	B1	B1
673	108] Kairo (ET)	Hotz16375	BE	bed-3	RC7	RC7	728	N 41.98; E 9.4	899/01T4	B	berg-1	B1	B1
674	N 30.05; E 31.25	Hotz16376	BE	bed-3	RC7	RC7	729	32] Chioggia (I)	919/01T3		less-7	hetero	-
675		Hotz16377	BE	bed-3	RC7	RC7	730	N 45.23; E 12.29	919/01T4		-	hetero	-
676	109] Shahhat (LAR)	Lybien 2	BE	rid-5b	hetero	-	731	33] Civitella (I)	920/01T1		-	hetero	-
677	N 32.82; E 21.42	Lybien 8	BE	rid-5b	hetero	-	732	N 41.77; E 13.93	920/01T2		-	hetero	-
678	110] Edremit (TR)	J.179/03	R	cf.rid-4	-	-	733		920/01T3		-	B2	B2
679	N 39.58; E 27.02	J.180/03	R	cf.rid-4	hetero	-	734	34] Solenzara/Korsika(F)	ZMB62811	B	-	B1	-
680	111] Istanbul (TR)	Istanbul1	BE	cf.rid-6	hetero	-	735	N 41.85; E 9.4	ZMB62812	B	-	B1	-
681	N 41.02; E 28.97	Istanbul7	BE	cf.rid-6	-	-	736		T1	B	berg-1	B1	-
682	112] Ankara (TR)	Ankara1	BE	cf.rid-6	R10	-	737		T2	B	berg-1	B1	-
683	N 39.93; E 32.87	Ankara4	BE	cf.rid-6	-	-	738	35] Pianadi/Sizilien (I)	Hotz19590	B	-	B3	B3
684	113] Silifke (TR)	Hotz19394	R	cf.rid-17	RG1	RG1	739	N 37.67; E 15.00	Hotz19591	B	berg-3	-	-
685	N 36.37; E 33.93	Hotz19400	R	cf.rid-17	-	-	740		Hotz19592	B	-	B3	B3
686		Hotz19406	R	-	hetero	-	741		Hotz19593	B	-	-	-
687	114] Olympos (GR)	Hotz17207	C	cf.rid-14	RC16	RC16	742		Hotz19594	B	berg-3	hetero	-
688	Karpathos	Hotz17208	C	cf.rid-14	-	-	743		Hotz19595	B	-	B3	B3
689	N 35.58; E 27.13	Hotz17420	C	cf.rid-14	RC16	RC16	744	36] Tarsia (I)	Hotz19570	H	-	L11	rekRL
690	115] Kerkyra (GR)	Hotz19482	R	-	hetero	-	745	N 39.6; E 16.23	Hotz19571	H	-	hetero	-
	N 39.62; E 19.92						746		Hotz19572		berg-1	-	-
691	116] Kalanistra (GR)	ZMB49804	R	rid-5b	RC11	RC11	747		Hotz19573	H	-	hetero	-
	N 38.07; E 21.87						748		Hotz19574	H	-	R17	L12
692	117] Archipolis/Rhodos	Hotz17218	C	cf.rid-13	RC16	RC16	749		Hotz19586	H	berg-1	hetero	-
693	N 36.25; E 28.03 (GR)						750		Hotz19589	H	-	hetero	-

ANHANG 1 – Fortsetzung, Proben 751 - 860

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
751	137] Hoher Atlas (MA)	Amp/Mor8	SA	sah-3	hetero	-	806	155] Isparta - Sucati (TR)	32103	BE	-	R10	RC5
752	N 31.13; E -7.92	Hotz16663	SA	sah-4	hetero	-	807	N 37.55; E 30.77	32105	BE	-	R10	RC5
753	138] Asilah (MA)	Hotz16692	SA	sah-3	-	-	808	(OBBKCA)	32106	BE	-	R10	RG1
	N 35.47; E -6.04						809		32107	BE	-	R10	RC5
754	139] Monchique (P)	ZMB58894	P	perez-3	P3	P3	810		32108	BE	-	R10	RG1
	N 37.32; E -8.57						811	156] Antalya (A.) (TR)	7111	BE	-	R10	RC5
755	140] Alepu See/Sozopol	ZMB47004	R	rid-1	R2	R8	812	Duzlercami	7112	BE	-	R10	RG1
	N 42.22; E 27.42 (BG)						813	N 36.98; E 30.56	7113	BE	-	R10	R10
756	141] Ptuj (SLO)	SLOB12	R	-	hetero	-	814	(HKHSBKCAO)	7114	BE	-	RG1	RG1
757	N 46.42; E 15.87	SLOB2	R	-	hetero	-	815	157] A.-Karamanli Brook	7117	BE	-	R11	R11
758		SLOB8	R	less-1	L1	L12	816	N 36.96; E 30.51 (TR)	7118	BE	-	RG1	RG1
759	142] Polis (CY)	Nöllert'05	R	-	R2	R8	817	(HKHSBKCAO)	7119	BE	-	R10	RG1
760	N 35.04; E 32.42	Nöllert'05	R	-	R2	R8	818	158] A.-Kirkgoz (TR)	7122	BE	-	R10	R11
761	143] Burdur Lake (TR)	1517	BE	-	R10	R10	819	N 37.11; E 30.58	7123	BE	-	R10	R11
762	N 37.72; E 30.1	1518	BE	-	R10	RG1	820	(HKHSBKCAO)	7124	BE	-	R11	R11
763	(CBCAST)	1519	BE	-	RC5	RC5	821	159] A.-Manay (TR)	7130	BE	-	RC5	RG1
764		1520	BE	-	R10	R10		N37.8; E29.9 (VDBKCAO)					
765	144] Denizli - Gemis (TR)	1521	BE	-	R10	RC5	822	160] B. Kemer (TR)	15137	BE	-	RC5	RC5
766	N 37.77; E 29.1	1522	BE	-	R10	R10	823	N 37.38; E 30.4	15138	BE	-	R10	RC5
767	(CBCAST)	1523	BE	-	R10	R10	824	(MHSACA)	15139	BE	-	R10	R10
768		1524	BE	-	RG1	RG1	825		15140	BE	-	R10	R10
769		1525	BE	-	R10	RG1	826		15141	BE	-	R10	RC5
770		1526	BE	-	RC5	RG1	827		15142	BE	-	R10	RC5
771		1527	BE	-	R10	RG1	828	161] B.-Tefenni (TR)	15144	BE	-	R10	R10
772		1528	BE	-	R10	RC5	829	N 37.25; E 29.79	15145	BE	-	R10	RG1
773		1529	BE	-	R10	RC5	830	(YECA)	15146	BE	-	R10	RC5
774		1530	BE	-	R10	R10	831	(KYECA)	15147	BE	-	R10	RC5
775		1531	BE	-	R10	R10	832		15148	BE	-	RC5	RC5
776	145] Aksehir Lake (TR)	4240	BE	-	R10	R10	833		15149	BE	-	R10	R10
	N38.47; E31.42 (CBCAST)						834		15150	BE	-	RC5	RC5
777	146] Denizli-Isikli Lake	2047	BE	-	R10	R10	835	162] B.-Cavdir (TR)	15151	BE	-	R10	RC5
778	N 38.32; E 29.85 (TR)	2050	BE	-	R10	R10		N37.10; E29.70 (MAHACA)					
779	(CBCA)	2052	BE	-	R10	R10	836	163] Denizli-Gökpınar (TR)	20154	BE	-	R10	RC5
780	147] Burdur (B.)-Bucak	1568	BE	-	R10	R10	837	N 37.76; E 29.12	20155	BE	-	R10	RC5
781	N 37.46; E 30.56 (TR)	1570	BE	-	RG1	RG1	838	(CCYZCA)	20156	BE	-	R10	RC5
782	(MTAECA)	1571	BE	-	R10	RC5	839	164] Alsaray-Esmekaya (TR)	68173	BE	-	R11	R11
783		1572	BE	-	R10	RC5		N38.26; E33.45 (TBOECA)					
784		1574	BE	-	R10	RC5	840	165] Aksaray-Cihanbeyli (TR)	68174	BE	-	R10	R2
785		1575	BE	-	R10	R10		N38.53; E33.21 (TBOECA)					
786		1576	BE	-	R10	RC5	841	166] A.-Alanya (TR)	7177	BE	-	hetero	-
787		1577	BE	-	R10	R10	842	N36.60; E32.3 (MHTCAO)	7178	BE	-	hetero	-
788	148] B.-Yesilova Sazadin	1579	BE	-	R10	R10	843	167] Edirne-Yagcili (TR)	22179	BE	-	R2	R2
789	N 37.50; E 29.75 (TR)	1580	BE	-	R10	RC5	844	N 41.78; E 26.82 (MACA)	22181	BE	-	R4	R4
790	(ISCA)	1581	BE	-	R10	RC5	845	168] Konya-Seydisehir (TR)	42199	BE	-	R2	R2
791		1582	BE	-	R10	RC5		N 37.38; E 31.88 (SGCA)					
792	149] B.-Yesilova Catkili (TR)	1583	BE	-	R10	R10	846	169] Karaman-Godet Dam	70206	BE	-	R2	R2
	N 37.48; E 29.73 (ISCA)						847	N37.38; E31.88 (OYCA) (TR)	70208	BE	-	R2	R2
793	150] B.-Yesilova Salda (TR)	1584	BE	-	R10	RC5	848	170] Mugla-Marmaris (TR)	48209	BE	-	R11	RC5
794	N 37.53; E 29.66 (ISCA)	1585	BE	-	RC5	RC5	849	N 36.85; E 28.23	48210	BE	-	R10	R11
795	151] Yesilova Karamanli	1587	BE	-	RG1	RG1	850	(AKCA)	48211	BE	-	R11	R11
796	N37.42; E29.82 (ISCA) (TR)	1589	BE	-	R10	R10	851		48212	BE	-	R11	R11
797	152] Afyon-Eber Lake (TR)	3184	BE	-	R10	R10	852	171] Mugla - Fethiye (TR)	48213	BE	-	RC5	R11
798	N 38.62; E 31.6 (CBCAO)	3186	BE	-	R10	R10	853	N 36.62; E 29.12	48214	BE	-	RC5	R11
799	153] B.-Bucak I (TR)	1593	BE	-	R10	RC5	854	(AKCA)	48215	BE	-	RC5	R11
800	N 37.40; E 30.73	1594	BE	-	RG1	RG1	855		48216	BE	-	R11	R11
801	(OAOBBKCA)	1596	BE	-	R10	RC5	856	172] Antalya - Kas (TR)	7217	BE	-	RC5	R11
802	154] B.-Bucak II (TR)	1598	BE	-	RG1	RC5	857	N 36.2; E 29.63	7218	BE	-	R11	R11
803	N 37.43; E 30.76	1597	BE	-	R10	RG1	858	(CAO)	7219	BE	-	R11	R11
804	(OBBKCA)	1599	BE	-	R10	RC5	859	173] Adana-Yumurtalik	162	BE	-	RC6	RC6
805		16101	BE	-	R10	RC5	860	N 36.77; E 35.78 (TR)	163	BE	-	RC6	RC6

ANHANG 1 – Fortsetzung, Proben 861 - 907

Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2	Nr.	Fundort	Labor Nr.	PT	HT	A1	A2
861	(TBCASEO)	154	BE	-	RC6	RC6	884		328	BE	-	R10	RG1
862		155	BE	-	RC6	RC6	885		329	BE	-	R10	RG1
863		166	BE	-	RC6	RC6	886	182] Isparta (I.)-Kovada	3214	BE	-	RG1	RC6
864	174] A.-Avlan Elmali Lake	7165	BE	-	R11	RC5	887	N 37.7; E 30.95 (TR)	3215	BE	-	RG1	RG1
865	N 36.73; E 29.93 (TR)	7166	BE	-	R11	RC5	888	(CBCAST)	3216	BE	-	RG1	RG1
866	(HSO)	7169	BE	-	R10	R11	889	183] Metaponto (I)	ZMB62804		berg-2	hetero	-
867	175] Konya - Ivriz (TR)	42220	BE	-	R13	R13	890	N 40.37; E 16.8	ZMB62803		-	B2	B2
	N 37.4; E 34.17 (OK)						891		ZMB62799		-	hetero	-
868	176] Mersin - Üseli (TR)	33224	BE	-	RC6	RC6	892		ZMB62801		-	hetero	-
	N 36.8; E 34.63 (SOCA)						893		ZMB62802		-	hetero	-
869	177] A.-Gözümevi (TR)	7132	BE	-	R10	RG1	894	184] Alanya (TR)	Hotz40195	R	cf.rid-17	-	-
870		7134	BE	-	RG1	RG1	895	N 36.33; E 32.00	Hotz40198	R	cf.rid-17	-	-
871	(VDBKCAO)	7135	BE	-	RG1	RG1	896	185] Foca (TR)	J.197/03	R	cf.rid-11	-	-
872	(VDO)	7136	BE	-	RG1	RG1	897	N 38.67; E 26.76	J.198/03	R	cf.rid-1	-	-
873	178] A.-Kuşunlu (TR)	72a	BE	-	hetero	-	898		J.199/03	R	cf.rid-11	-	-
874	N 37.08; E 30.85	75a	BE	-	RG1	RG1	899		J.205/03	R	cf.rid-1	-	-
875	(CBCASTO)	74	BE	-	R10	RG1	900	186] Oetzbasi (TR)	Hotz17510	R	cf.rid-1	-	-
876	179] I.-Asagi Gokdere (TR)	3242	BE	-	RG1	RG1	901	N 37.62; E 27.43	Hotz17511	R	cf.rid-1	-	-
	N 37.57; E 30.83 (CBCA)						902		Hotz17716	R	cf.rid-1	-	-
877	180] I.-Egirdir Lake (TR)	3233	BE	-	R10	RG1	903	187] Ceyhan (TR)	Hotz17303	BE	cf.rid-18	-	-
878	N 37.87; E 30.85(CBCAST)	3234	BE	-	RG1	RG1	904	N 37.02; E 35.82	Hotz17305	BE	cf.rid-18	-	-
879	181] I.-Karacaören (TR)	3210	BE	-	R10	RG1	905	188] Biska (DZ)	Hotz16742	SA	sah-1	hetero<	-
880	N 37.42; E 30.83	3211	BE	-	RG1	RC5	906	N 35.85; E 05.73	Hotz16743	SA	sah-2	hetero<	-
881	(CBCAST)	3212	BE	-	R10	RG1	907	189] El Golea (DZ)	Hotz16735	SA	sah-2	hetero<	-
882		3213	BE	-	RG1	RC6		N 30.57; E 02.88					
883		327	BE	-	R10	RC5							

ANHANG 2: Bilder ausgewählter Fundorte.

Die Nummern der Fundorte sind jeweils links oben angegeben.

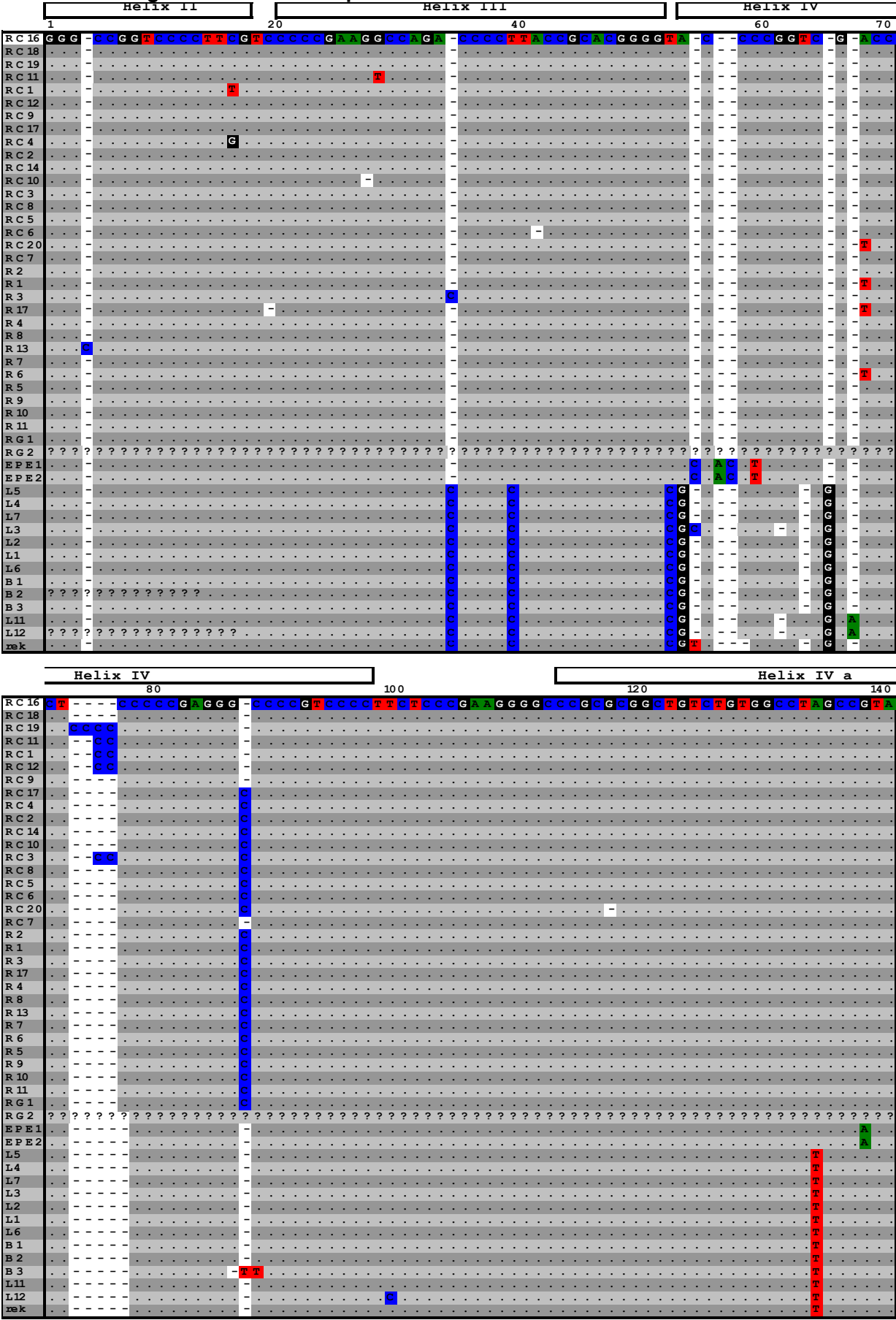


ANHANG 2: Fortsetzung: Bilder ausgewählter Fundorte.

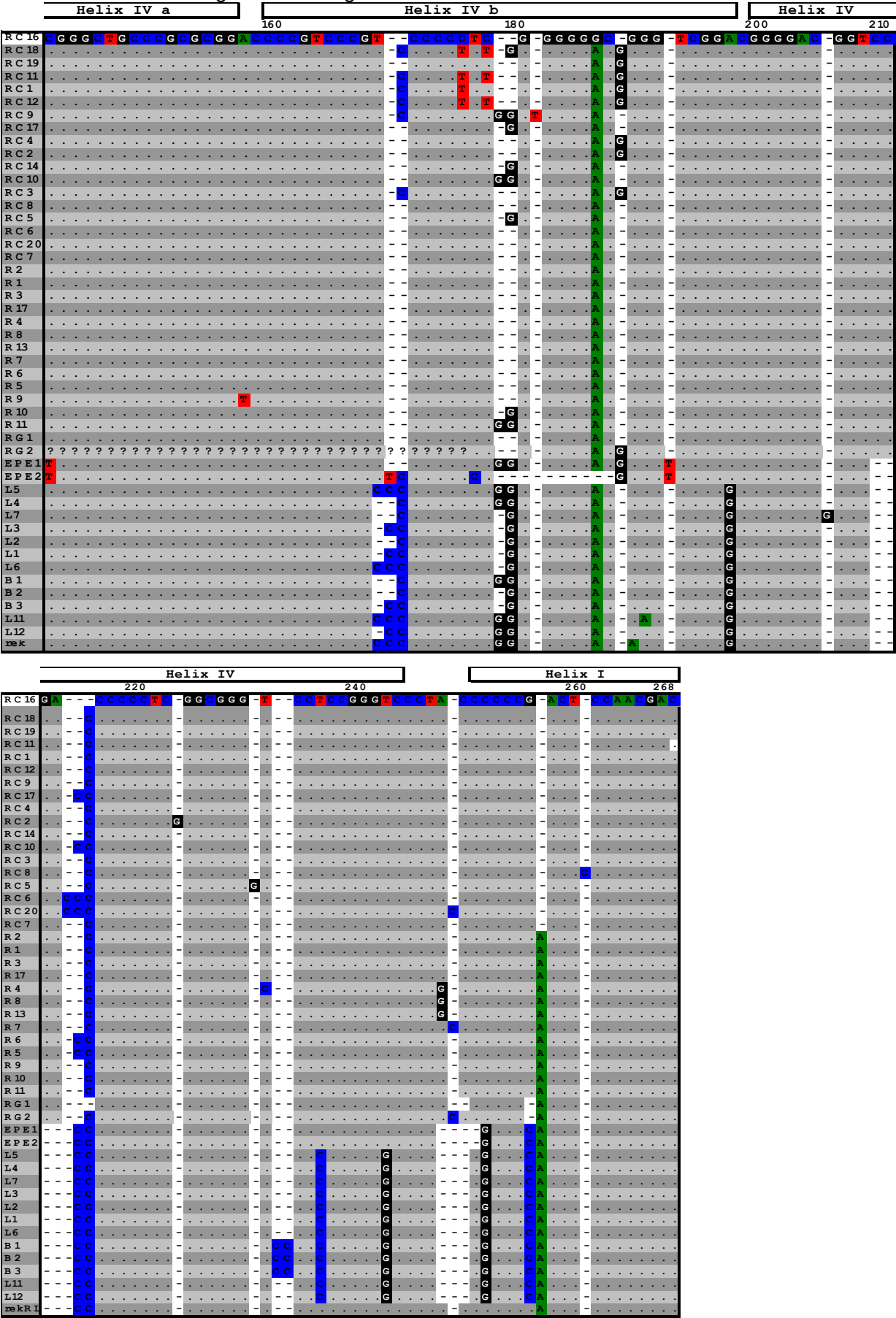
ANHANG 3: Entwicklungsstadien der aufgezogenen Larven (nach Günther 1990).
 Die Modalwerte sind fett gekennzeichnet. n-Gesamtzahl der Larven an jedem Untersuchungstag, Ø-Mittelwerte aus den Entwicklungsstadien, s-Standardabweichungen.

Freiland															
Kreuzung	Beobachtungstag	Entwicklungsstadien											n	Ø	s
		25	26	27	28	29	30	31	32						
Hybriden - Interspezifisch <i>R. ridibunda</i> x <i>R. cf. ridibunda</i>	5		7	27						34	26,79	0,41			
	11		3	9	22					34	27,56	0,66			
	18		3	4	27					34	27,71	0,63			
	26		2	4	8	20				34	28,35	0,92			
	33			5	9	20				34	28,44	0,75			
	40			1	3	3	22			29	29,59	0,83			
	43			1	3	3	21			28	29,57	0,84			
	50			1	2	2	10	13		28	30,14	1,08			
Autochthon - Intraspezifisch <i>R. ridibunda</i> x <i>R. ridibunda</i>	5		30	10						40	26,25	0,44			
	11		19	21						40	26,53	0,51			
	18		10	29	1					40	26,78	0,48			
	26			31	9					40	27,23	0,42			
	33			4	36					40	27,90	0,30			
	40				19	19				38	28,50	0,51			
	43					32	6			38	29,16	0,37			
	50					16	22			38	29,58	0,50			
Allochthon - Intraspezifisch <i>R. cf. ridibunda</i> x <i>R. cf. ridibunda</i>	5														
	11	19								19	25,00	0			
	18		19							19	26,00	0			
	26			19						19	27,00	0			
	33			10	9					19	27,47	0,51			
	40				18	1				19	28,05	0,23			
	43				9	10				19	28,53	0,51			
	50					10	9			19	29,47	0,51			
Labor															
Hybriden - Interspezifisch <i>R. ridibunda</i> x <i>R. cf. ridibunda</i>	5		3	15						18	26,83	0,38			
	11		3	6	9					18	27,33	0,68			
	18		3	1	5	9				18	28,11	1,09			
	26		3		3	4	7			17	28,70	1,44			
	33			1	2	2	10			15	29,40	0,95			
	40					1	3	8	2	14	30,78	0,77			
	43					1	3	5	4	13	30,92	0,95			
	50						2	3	5	10	31,30	0,82			
Autochthon - Intraspezifisch <i>R. ridibunda</i> x <i>R. ridibunda</i>	5		11	9						20	26,45	0,49			
	11			20						20	27,00	0,00			
	18			7	13					20	27,60	0,58			
	26				5	15				20	28,75	0,43			
	33				1	10	9			20	29,35	0,57			
	40						6	6	2	14	30,71	0,69			
	43						4	8	2	14	30,86	0,64			
	50							7	5	12	31,41	0,49			
Allochthon - Intraspezifisch <i>R. cf. ridibunda</i> x <i>R. cf. ridibunda</i>	5														
	11	18								18	25,00	0			
	18			17						17	27,00	0			
	26			4	13					17	27,76	0,42			
	33				2	15				17	28,88	0,32			
	40					4	12			16	29,75	0,43			
	43					1	11	4		16	30,18	0,53			
	50							11	5	16	31,31	0,46			

ANHANG 4: Alignment der ITS2-Sequenzen.



ANHANG 4: Fortsetzung des ITS2-Alignments.



[illegible]

ANHANG 6: Paarweise Vergleiche der ITS2-Allele.

Obere Matrix: p-Distanzen (in %), untere Matrix: Zahl der Substitutionen.

	RC16	RC18	RC19	RC11	RC1	RC12	RC9	RC17	RC4	RC2	RC14	RC10	RC3	RC8	RC5	RC6	RC20	RC7	R2	R1	R3	R17	R4
RC16	—	2.6	2.6	3.4	3.0	3.0	2.2	1.9	1.9	1.9	1.5	2.6	2.6	1.5	1.9	1.9	3.0	1.1	1.5	1.9	1.9	2.2	2.2
RC18	7	—	3.0	1.5	1.9	1.1	1.9	2.2	2.2	2.2	1.9	3.0	2.2	2.6	2.2	3.0	4.1	2.2	2.6	3.0	3.0	3.4	3.4
RC19	7	8	—	2.2	1.9	1.9	3.4	3.0	2.2	2.2	2.6	3.7	1.5	2.6	3.0	3.0	4.1	2.2	2.6	3.0	3.0	3.4	3.4
RC11	9	4	6	—	1.1	0.4	3.4	3.7	3.0	3.0	3.4	4.5	1.5	3.4	3.7	3.7	4.9	3.0	3.4	3.7	3.7	4.1	4.1
RC1	8	5	5	3	—	0.8	3.0	3.4	2.2	2.6	3.0	4.1	1.1	3.0	3.4	3.4	4.5	2.6	3.0	3.4	3.4	3.7	3.7
RC12	8	3	5	1	2	—	3.0	3.4	2.6	2.6	3.0	4.1	1.1	3.0	3.4	3.4	4.5	2.6	3.0	3.4	3.4	3.7	3.7
RC9	6	5	9	9	8	8	—	1.9	2.6	2.6	1.5	1.9	2.6	2.2	1.9	2.6	3.7	1.9	2.2	2.6	2.6	3.0	3.0
RC17	5	6	8	10	9	9	5	—	1.5	1.5	0.4	0.8	2.2	1.1	0.8	0.8	1.9	1.5	1.1	1.5	1.5	1.9	1.9
RC4	5	6	6	8	6	7	7	4	—	0.8	1.1	2.2	1.5	1.1	1.5	1.5	2.6	1.5	1.1	1.5	1.5	1.9	1.9
RC2	5	6	6	8	7	7	7	4	2	—	1.1	2.2	1.5	1.1	1.5	1.5	2.6	1.5	1.1	1.5	1.5	1.9	1.9
RC14	4	5	7	9	8	8	4	1	3	3	—	1.1	1.9	0.8	0.4	1.1	2.2	1.1	0.8	1.1	1.1	1.5	1.5
RC10	7	8	10	12	11	11	5	2	6	6	3	—	3.0	1.9	1.5	1.5	2.6	2.2	1.9	2.2	2.2	2.6	2.6
RC3	7	6	4	4	3	3	7	6	4	4	5	8	—	1.9	2.2	2.2	3.4	2.2	1.9	2.2	2.2	2.6	2.6
RC8	4	7	7	9	8	8	6	3	3	3	2	5	5	—	1.1	1.1	2.2	1.1	0.8	1.1	1.1	1.5	1.5
RC5	5	6	8	10	9	9	5	2	4	4	1	4	6	3	—	1.5	2.6	1.5	1.1	1.5	1.5	1.9	1.9
RC6	6	9	9	11	10	10	8	3	5	5	4	5	7	4	5	—	1.1	1.5	1.1	1.5	1.5	1.9	1.9
RC20	8	11	11	13	12	12	10	5	7	7	6	7	9	6	7	3	—	1.9	2.2	1.9	2.6	2.2	3.0
RC7	2	5	5	7	6	6	4	3	3	3	2	5	5	2	3	4	6	—	1.1	1.5	1.5	1.9	1.9
R2	4	7	7	9	8	8	6	3	3	3	2	5	5	2	3	3	6	3	—	0.4	0.4	0.8	0.8
R1	5	8	8	10	9	9	7	4	4	4	3	6	6	3	4	4	5	4	1	—	0.8	0.4	1.1
R3	5	8	8	10	9	9	7	4	4	4	3	6	6	3	4	4	7	4	1	2	—	1.1	1.1
R17	6	9	9	11	10	10	8	5	5	5	4	7	7	4	5	5	6	5	2	1	3	—	1.5
R4	6	9	9	11	10	10	8	5	5	5	4	7	7	4	5	5	8	5	2	3	3	4	—
R8	5	8	8	10	9	9	7	4	4	4	3	6	6	3	4	4	7	4	1	2	2	3	1
R13	6	9	9	11	10	10	8	5	5	5	4	7	7	4	5	5	8	5	2	3	3	4	2
R7	5	8	8	10	9	9	7	4	4	4	3	6	6	3	4	4	5	4	1	2	2	3	3
R6	6	9	9	11	10	10	8	3	5	5	4	5	7	4	5	3	4	5	2	1	3	2	4
R5	5	8	8	10	9	9	7	2	4	4	3	4	6	3	4	2	5	4	1	2	2	3	3
R9	5	8	8	10	9	9	7	4	4	4	3	6	6	3	4	4	7	4	1	2	2	3	3
R10	5	6	8	10	9	9	5	2	4	4	1	4	6	3	2	4	7	4	1	2	2	3	3
R11	6	7	9	11	10	10	4	3	5	5	2	3	7	4	3	5	8	5	2	3	3	4	4
RG1	5	10	10	12	11	11	9	6	6	6	5	8	8	5	6	6	9	6	3	4	4	5	5
EPE1	25	24	26	28	27	27	23	21	23	23	22	21	25	24	23	24	26	23	22	23	23	24	23
EPE2	32	32	34	34	33	33	33	31	31	31	32	33	31	32	33	32	34	31	30	31	31	32	31
L5	29	28	32	32	31	31	25	25	29	29	26	25	29	28	27	28	30	27	26	27	25	28	27
L4	28	27	31	31	30	30	24	24	28	28	25	24	28	27	26	27	29	26	25	26	24	27	26
L7	28	27	31	31	30	30	26	24	28	28	25	26	28	27	26	27	29	26	25	26	24	27	26
L3	30	29	33	33	32	32	28	26	30	30	27	28	30	29	28	29	31	28	27	28	26	29	28
L2	27	26	30	30	29	29	25	23	27	27	24	25	27	26	25	26	28	25	24	25	23	26	25
L1	28	27	31	31	30	30	26	24	28	28	25	26	28	27	26	27	29	26	25	26	24	27	26
L6	28	27	31	31	30	30	26	24	28	28	25	26	28	27	26	27	29	26	25	26	24	27	26
B1	30	29	33	33	32	32	26	26	30	30	27	26	30	29	28	29	31	28	27	28	26	29	28
B2	29	28	32	32	31	31	27	25	29	29	26	27	29	28	27	28	30	27	26	27	25	28	27
B3	31	30	34	34	33	33	29	28	32	32	29	30	32	31	30	31	33	29	29	30	28	31	30
L11	31	30	34	34	33	33	27	27	31	31	28	27	31	30	29	30	32	29	28	29	27	30	29
L12	31	30	34	34	32	33	27	27	30	31	28	27	31	30	29	30	32	29	28	29	27	30	29

	R8	R13	R7	R6	R5	R9	R10	R11	RG1	EPE1	EPE2	L5	L4	L7	L3	L2	L1	L6	L8	L9	L10	L11	L12
RC16	1.9	2.2	1.9	2.2	1.9	1.9	1.9	2.2	1.9	9.0	11.6	10.5	10.1	10.1	10.8	9.7	10.1	10.1	10.8	11.0	11.9	11.2	11.9
RC18	3.0	3.4	3.0	3.4	3.0	3.0	2.2	2.6	3.7	8.6	11.6	10.1	9.7	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.5	10.6	11.6	10.8	11.5
RC19	3.0	3.4	3.0	3.4	3.0	3.0	3.0	3.4	3.7	9.3	12.3	11.6	11.2	11.2	11.9	10.8	11.2	11.2	11.9	12.2	13.1	12.3	13.1
RC11	3.7	4.1	3.7	4.1	3.7	3.7	3.7	4.1	4.5	10.1	12.3	11.6	11.2	11.2	11.9	10.8	11.2	11.2	11.9	12.2	13.1	12.3	13.1
RC1	3.4	3.7	3.4	3.7	3.4	3.4	3.4	3.7	4.1	9.7	11.9	11.2	10.8	10.8	11.6	10.5	10.8	10.8	11.6	11.8	12.7	11.9	12.3
RC12	3.4	3.7	3.4	3.7	3.4	3.4	3.4	3.7	4.1	9.7	11.9	11.2	10.8	10.8	11.6	10.5	10.8	10.8	11.6	11.8	12.7	11.9	12.7
RC9	2.6	3.0	2.6	3.0	2.6	2.6	1.9	1.5	3.4	8.2	11.9	9.0	8.6	9.3	10.1	9.0	9.3	9.3	9.3	10.2	11.2	9.7	10.3
RC17	1.5	1.9	1.5	1.1	0.8	1.5	0.8	1.1	2.2	7.8	11.6	9.3	9.0	9.0	9.7	8.6	9.0	9.0	9.7	9.8	10.5	10.1	10.7
RC4	1.5	1.9	1.5	1.9	1.5	1.5	1.5	1.9	2.2	8.6	11.6	10.8	10.5	10.5	11.2	10.1	10.5	10.5	11.2	11.4	11.9	11.6	11.9
RC2	1.5	1.9	1.5	1.9	1.5	1.5	1.5	1.9	2.2	8.6	11.6	10.8	10.5	10.5	11.2	10.1	10.5	10.5	11.2	11.4	11.9	11.6	12.3
RC14	1.1	1.5	1.1	1.5	1.1	1.1	0.4	0.8	1.9	8.2	11.9	9.7	9.3	9.3	10.1	9.0	9.3	9.3	10.1	10.2	10.8	10.5	11.1
RC10	2.2	2.6	2.2	1.9	1.5	2.2	1.5	1.1	3.0	7.8	12.3	9.3	9.0	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.6	11.2	10.1	10.7	
RC3	2.2	2.6	2.2	2.6	2.2	2.2	2.2	2.6	3.0	9.3	11.6	10.8	10.5	10.5	11.2	10.1	10.5	10.5	11.2	11.4	11.9	11.6	12.3
RC8	1.1	1.5	1.1	1.5	1.1	1.1	1.1	1.5	1.9	9.0	11.9	10.5	10.1	10.1	10.8	9.7	10.1	10.1	10.8	11.0	11.6	11.2	11.9
RC5	1.5	1.9	1.5	1.9	1.5	1.5	0.8	1.1	2.2	8.6	12.3	10.1	9.7	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.5	10.6	11.2	10.8	11.5
RC6	1.5	1.9	1.5	1.1	0.8	1.5	1.5	1.9	2.2	8.6	11.6	10.1	9.7	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.5	10.6	11.2	10.8	11.5
RC20	2.6	3.0	1.9	1.5	1.9	2.6	2.6	3.0	3.4	9.0	11.9	11.2	10.8	10.8	10.8	10.5	10.8	10.8	11.6	11.8	12.3	11.9	12.7
RC7	1.5	1.9	1.5	1.9	1.5	1.5	1.5	1.9	2.2	7.8	10.8	10.1	9.7	9.7	9.7	9.3	9.7	9.7	10.5	10.6	11.6	10.8	11.5
R2	0.4	0.8	0.4	0.8	0.4	0.4	0.4	0.8	1.1	8.2	11.2	9.7	9.3	9.3	10.1	9.0	9.3	9.3	10.1	10.2	10.8	10.5	11.1
R1	0.8	1.1	0.8	0.4	0.8	0.8	0.8	1.1	1.5	8.6	11.6	10.1	9.7	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.5	10.6	11.2	10.8	11.5
R3	0.8	1.1	0.8	1.1	0.8	0.8	1.1	1.5	8.6	11.6	9.3	9.0	9.0	9.7	8.6	9.0	9.0	9.7	9.8	10.5	10.1	10.7	
R17	1.1	1.5	1.1	0.8	1.1	1.1	1.1	1.5	1.9	9.0	11.9	10.5	10.1	10.1	10.8	9.7	10.1	10.1	10.8	11.0	11.6	11.2	11.9
R4	0.4	0.8	1.1	1.5	1.1	1.1	1.1	1.5	1.9	8.6	11.6	10.1	9.7	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.5	10.6	11.2	10.8	11.5
R8	—	0.4	0.8	1.1	1.1	0.8	0.8	1.1	1.5	8.2	11.2	9.7	9.3	9.3	10.1	9.0	9.3	9.3	10.1	10.2	10.8	10.5	11.1
R13	1	—	1.1	1.5	1.1	1.1	1.1	1.5	1.9	8.6	11.6	10.1	9.7	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.5	10.2	11.2	10.8	11.1
R7	2	3	—	1.1	0.8	0.8	0.8	1.1	1.5	8.6	11.6	10.1	9.7	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.5	10.6	11.2	10.8	11.5
R6	3	4	3	—	0.4	1.1	1.1	1.5	1.9	8.2	11.2	9.7	9.3	9.3	10.1	9.0	9.3	9.3	10.1	10.2	10.8	10.5	11.1
R5	2	3	2	1	—	0.8	0.8	1.1	1.5	7.8	10.8	9.3	9.0	9.0	9.7	8.6	9.0	9.0	9.7	9.8	10.5	10.1	10.7
R9	2	3	2	3	2	—	0.8	1.1	1.5	8.6	11.6	10.1	9.7	9.7	10.5	9.3	9.7	9.7	10.5	10.6	11.2	10.8	11.5
R10	2	3	2	3	2	2	—	0.4	1.5	7.8	11.6	9.3	9.0	9.0	9.7	8.6	9.0	9.0	9.7	9.8	10.5	10.1	10.7
R11	3	4	3	4	3	3	1	—	1.9	7.5	11.9	9.0	8.6	9.3	10.1	9.0	9.3	9.3	10.2	10.8	9.7	10.3	
RG1	4	5	4	5	4	4	5	—	8.2	11.6	9.7	9.3	9.3	10.1	9.0	9.3	9.3	10.1	10.2	10.8	10.5	11.1	
EPE1	22	23	23	22	21	23	21	20	22	—	4.9	8.2	7.8	8.6	8.6	8.2	8.6	8.6	8.6	9.4	10.5	9.0	9.5
EPE2	30	31	31	30	29	31	31	32	30	12	—	11.6	11.6	11.6	11.2	11.2	11.2	11.2	12.3	12.5	13.1	12.3	13.1
L5	26	27	27	26	25	27	25	24	26	22	31	—	0.8	1.5	1.5	1.1	0.8	0.4	1.5	2.0	2.6	1.5	2.0
L4	25	26	26	26	25	24	26	24	23	25	21	31	2	—	0.8	1.5	0.4	0.8	1.1	0.8	1.2	2.6	2.2
L7	25	26	26	26	25	24	26	24	25	25	23	31	4	2	—	1.5	0.4	0.8	1.1	1.5	1.2	2.6	3.0
L3	27	28	28	27	26	28	26	27	27	23	30	4	4	4	—	1.1	0.8	1.1	2.2	2.0	2.6	2.2	
L2	24	25	25	24	23	25	23	24	24	22	30	3	1	1	3	—	0.4	0.8	1.1	0.8	2.2	2.6	2.4
L1	25	26	26	25	24	26	24	25	25	23	30	2	2	2	2	1	—	0.4	1.5	1.2	1.9	2.2	2.0
L6	25	26	26	25	24	26	24	25	25	23	30	1	3	3	3	2	1	—	1.9	1.6	2.2	1.9	2.4
B1	27	28	28	27	26	28	26	25	27	23	33	4	2	4	6	3	4	5	—	0.4	1.9	3.0	2.8
B2	26	26	27	26	25	27	25	26	26	24	32	5	3	3	5	2	3	4	1	—	1.6	3.5	3.2
B3	29	30	30	29	28	30	28	29	29	28	35	7	7	7	7	6	5	6	5	4	—	4.1	4.0
L11	28	29	29	28	27	29	27	26	28	24	33	4	6	8	6	7	6	5	8	9	11	—	1.2
L12	28	28	29	28	27	29	27	26	28	24	33	5	5	7	5	6	5	6	7	8	10	3	—

ANHANG 7: Paarweise Vergleiche der mt-Genotypen (ND3).

Obere Matrix: p-Distanzen (in %), untere Matrix: Zahl der Transitionen/Transversionen.

	rid																cf.rid															
	1	3	4	5b	6b	7b	8b	9b	10b	11b	12b	13b	14b	15b	16b	17b	18b	19b	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	
rid-1	—	0,6	0,6	0,9	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	0,9	1,2	1,5	0,9	1,2	1,5	1,8	0,6	1,2	1,2	6,5	6,2	5,9	5,9	5,3	6,2	7,1	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9
rid-3	2/0	—	0,6	1,5	1,8	1,8	1,8	1,8	1,5	1,8	1,5	1,5	1,8	2,1	2,4	1,2	1,8	1,8	5,9	5,6	5,3	5,3	4,7	5,6	6,5	5,0	5,6	5,6	6,2	5,6	5,3	
rid-4	2/0	2/0	—	1,5	1,8	1,8	1,8	1,8	1,5	1,8	1,5	1,5	1,8	1,5	1,8	1,2	1,2	1,8	5,9	5,6	5,3	5,3	4,7	5,6	6,5	5,0	5,6	5,6	6,2	5,6	5,3	
rid-5b	3/0	5/0	5/0	—	0,9	0,9	0,9	0,9	0,6	0,3	1,2	0,6	0,3	1,2	0,9	0,3	0,3	0,3	6,8	6,5	6,2	6,2	5,6	6,5	6,8	5,9	6,5	6,5	7,1	6,5	6,2	
rid-6b	4/0	6/0	6/0	3/0	—	0,6	0,6	0,6	0,3	1,2	0,9	0,9	1,2	0,9	1,2	0,6	1,2	1,2	6,5	6,2	5,9	5,9	5,9	6,2	7,1	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9	
rid-7b	4/0	6/0	6/0	3/0	2/0	—	0,6	0,6	0,3	1,2	0,9	0,9	1,2	0,9	1,2	0,6	1,2	1,2	6,5	6,2	5,9	5,9	5,9	6,2	7,1	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9	
rid-8b	4/0	6/0	6/0	3/0	2/0	2/0	—	0,6	0,3	1,2	0,9	0,9	1,2	0,9	1,2	0,6	1,2	1,2	6,5	6,2	5,9	5,9	5,9	6,2	7,1	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9	
rid-9b	4/0	6/0	6/0	3/0	2/0	2/0	2/0	—	0,3	1,2	0,9	0,9	1,2	0,9	1,2	0,6	1,2	1,2	6,5	6,2	5,9	5,9	5,9	6,2	7,1	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9	
rid-10b	3/0	5/0	5/0	2/0	1/0	1/0	1/0	1/0	—	0,9	0,6	0,6	0,9	0,6	0,9	0,3	0,9	0,9	6,2	5,9	5,6	5,6	5,6	5,9	6,8	5,3	5,9	5,9	6,5	5,9	5,6	
rid-11b	4/0	6/0	6/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0	3/0	—	1,5	0,9	0,6	1,5	1,2	0,6	0,6	0,6	7,1	6,8	6,5	6,5	5,9	6,8	7,1	6,2	6,8	6,8	7,4	6,8	6,5	
rid-12b	5/0	5/0	5/0	4/0	3/0	3/0	3/0	3/0	2/0	5/0	—	1,2	1,5	1,2	1,5	0,9	1,5	1,5	6,2	5,9	5,6	5,6	5,6	5,9	6,8	5,3	5,9	5,9	6,5	5,9	5,6	
rid-13b	3/0	5/0	5/0	2/0	3/0	3/0	3/0	3/0	2/0	3/0	4/0	—	0,9	1,2	1,5	0,3	0,9	0,9	6,5	6,2	5,9	5,9	5,3	6,2	7,1	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9	
rid-14b	4/0	6/0	6/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0	3/0	2/0	5/0	3/0	—	1,5	1,2	0,6	0,6	0,6	6,5	6,2	5,9	5,9	5,3	6,2	6,5	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9	
rid-15b	5/0	7/0	5/0	4/0	3/0	3/0	3/0	3/0	2/0	5/0	4/0	4/0	5/0	—	0,3	0,9	0,9	1,5	6,2	5,9	5,6	5,6	5,6	5,9	6,8	5,3	5,9	5,9	6,5	5,9	5,6	
rid-16b	6/0	8/0	6/0	3/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	3/0	4/0	5/0	5/0	4/0	1/0	—	1,2	0,6	1,2	6,5	6,2	5,9	5,9	5,9	6,2	6,5	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9
rid-17b	2/0	4/0	4/0	1/0	2/0	2/0	2/0	2/0	1/0	2/0	3/0	1/0	2/0	3/0	4/0	—	0,6	0,6	6,5	6,2	5,9	5,9	5,3	6,2	7,1	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9	
rid-18b	4/0	6/0	4/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0	3/0	2/0	5/0	3/0	2/0	3/0	2/0	2/0	—	0,6	6,5	6,2	5,9	5,9	5,3	6,2	6,5	5,6	6,2	6,2	6,8	6,2	5,9	
rid-19b	4/0	6/0	6/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0	3/0	2/0	5/0	3/0	2/0	5/0	4/0	2/0	2/0	—	7,1	6,8	6,5	6,5	5,9	6,8	7,1	6,2	6,8	6,8	7,4	6,2	6,5	
cf.rid-1	19/3	17/3	17/3	20/3	19/3	19/3	19/3	19/3	18/3	21/3	18/3	19/3	19/3	18/3	19/3	19/3	19/3	21/3	—	0,3	0,6	0,6	1,2	0,9	2,9	0,9	1,2	0,9	0,9	2,1	1,8	
cf.rid-2	18/3	16/3	16/3	19/3	18/3	18/3	18/3	18/3	17/3	20/3	17/3	18/3	18/3	17/3	18/3	18/3	18/3	20/3	1/0	—	0,3	0,3	0,9	0,6	2,6	0,6	0,9	0,6	0,6	1,8	1,5	
cf.rid-3	17/3	15/3	15/3	18/3	17/3	17/3	17/3	17/3	16/3	19/3	16/3	17/3	17/3	16/3	17/3	17/3	17/3	19/3	2/0	1/0	—	0,6	1,2	0,9	2,4	0,9	1,2	0,9	0,9	2,1	1,8	
cf.rid-4	17/3	15/3	15/3	18/3	17/3	17/3	17/3	17/3	16/3	19/3	16/3	17/3	17/3	16/3	17/3	17/3	17/3	19/3	2/0	1/0	2/0	—	0,6	0,3	2,4	0,3	0,6	0,3	0,9	1,5	1,2	
cf.rid-5	15/3	13/3	13/3	16/3	17/3	17/3	17/3	17/3	16/3	17/3	16/3	15/3	15/3	16/3	17/3	15/3	15/3	17/3	4/0	3/0	4/0	2/0	—	0,9	2,9	0,3	1,2	0,9	1,5	2,1	1,8	
cf.rid-6	18/3	16/3	16/3	19/3	18/3	18/3	18/3	18/3	17/3	20/3	17/3	18/3	18/3	17/3	18/3	18/3	18/3	20/3	3/0	2/0	3/0	1/0	3/0	—	2,6	0,6	0,9	0,6	1,2	1,8	1,5	
cf.rid-7	18/6	16/6	16/6	17/6	18/6	18/6	18/6	18/6	17/6	18/6	17/6	18/6	16/6	17/6	16/6	18/6	16/6	18/6	7/3	6/3	5/3	5/3	7/3	6/3	—	2,6	2,9	2,6	3,2	3,2	2,9	
cf.rid-8	16/3	14/3	14/3	17/3	16/3	16/3	16/3	16/3	15/3	18/3	15/3	16/3	16/3	15/3	16/3	16/3	16/3	18/3	3/0	2/0	3/0	1/0	1/0	2/0	6/3	—	0,9	0,6	1,2	1,8	1,5	
cf.rid-9	19/2	17/2	17/2	20/2	19/2	19/2	19/2	19/2	18/2	21/2	18/2	19/2	19/2	18/2	19/2	19/2	19/2	21/2	3/1	2/1	3/1	1/1	3/1	2/1	6/4	2/1	—	0,9	1,5	2,1	1,8	
cf.rid-11	18/3	16/3	16/3	19/3	18/3	18/3	18/3	18/3	17/3	20/3	17/3	18/3	18/3	17/3	18/3	18/3	18/3	20/3	3/0	2/0	3/0	1/0	3/0	2/0	6/3	2/0	2/1	—	1,2	1,8	1,5	
cf.rid-12	20/3	18/3	18/3	21/3	20/3	20/3	20/3	20/3	19/3	22/3	19/3	20/3	20/3	19/3	20/3	20/3	20/3	22/3	3/0	2/0	3/0	3/0	5/0	4/0	8/3	4/0	4/1	4/0	—	2,4	2,1	
cf.rid-13	18/3	16/3	16/3	19/3	18/3	18/3	18/3	18/3	17/3	20/3	17/3	18/3	18/3	17/3	18/3	18/3	18/3	18/3	7/0	6/0	7/0	5/0	7/0	6/0	8/3	6/0	6/1	6/0	8/0	—	0,3	
cf.rid-14	17/3	15/3	15/3	18/3	17/3	17/3	17/3	17/3	16/3	19/3	16/3	17/3	17/3	16/3	17/3	17/3	17/3	19/3	6/0	5/0	6/0	4/0	6/0	5/0	7/3	5/0	5/1	5/0	7/0	1/0	—	
cf.rid-15	20/4	18/4	18/4	21/4	20/4	20/4	20/4	20/4	19/4	22/4	19/4	20/4	20/4	19/4	20/4	20/4	20/4	22/4	8/1	7/1	8/1	6/1	8/1	7/1	7/4	7/1	7/2	7/1	7/1	9/1	8/1	
cf.rid-16	20/7	18/7	18/7	19/7	20/7	20/7	20/7	20/7	19/7	20/7	19/7	20/7	18/7	19/7	18/7	20/7	18/7	20/7	9/4	8/4	7/4	7/4	9/4	8/4	3/1	8/4	8/5	8/4	10/4	10/4	9/4	
cf.rid-17	17/7	15/7	15/7	16/7	17/7	17/7	17/7	17/7	16/7	17/7	16/7	17/7	15/7	16/7	15/7	17/7	15/7	17/7	6/4	5/4	4/4	4/4	6/4	5/4	1/1	5/4	5/5	5/4	7/4	7/4	6/4	
cf.rid-18	15/3	13/3	13/3	16/3	17/3	17/3	17/3	17/3	16/3	17/3	16/3	15/3	15/3	16/3	17/3	15/3	15/3	17/3	12/2	11/2	10/2	10/2	10/2	11/2	9/5	11/2	12/1	11/2	11/2	11/2	10/2	
cf.rid-19	23/3	21/3	21/3	24/3	23/3	23/3	23/3	23/3	22/3	25/3	22/3	23/3	23/3	22/3	23/3	23/3	23/3	25/3	12/2	11/2	10/2	10/2	12/2	11/2	9/5	11/2	10/1	11/2	11/2	13/2	12/2	
R.spec-1	28/2	26/2	26/2	29/2	28/2	28/2	28/2	28/2	27/2	28/2	27/2	28/2	28/2	27/2	28/2	28/2	28/2	30/2	17/1	18/1	17/1	19/1	21/1	20/1	18/4	20/1	21/0	18/1	18/1	20/1	19/1	
bed-1	19/2	19/2	17/2	20/2	19/2	19/2	19/2	19/2	18/2	21/2	18/2	19/2	21/2	18/2	19/2	19/2	19/2	21/2	16/1	17/1	16/1	16/1	18/1	17/1	15/4	17/1	18/0	17/1	17/1	15/1	14/1	
bed-2	18/2	18/2	16/2	19/2	18/2	18/2	18/2	18/2	17/2	20/2	17/2	18/2	20/2	17/2	18/2	18/2	18/2	20/2	15/1	16/1	15/1	15/1										

ANHANG 7: Fortsetzung: Paarweise Vergleiche der mt-Genotypen.

	cf.rid					spec	bed			cre			epe			berg			less						shq	perezi				sah			
	15	16	17	18	19	1	1	2	3	1	2	2	3	1	2	3	1	2	3	5	6	7	1	1	2	3	1	2	3	4			
rid-1	7.1	7.9	7.1	5.3	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	12.6	12.1	11.5	13.2	16.2	15.6	15.3	15.3	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.0	18.5	18.5	18.2	19.4	19.4	18.5	18.8			
rid-3	6.5	7.4	6.5	4.7	7.1	8.2	6.2	5.9	5.3	12.6	12.1	11.5	13.2	15.6	15.0	14.7	14.7	15.0	15.0	15.0	14.7	15.0	15.0	18.5	18.5	18.2	20.0	19.4	18.5	18.8			
rid-4	6.5	7.4	6.5	4.7	7.1	8.2	5.6	5.3	5.3	12.6	12.1	11.5	13.2	15.6	15.0	14.7	14.7	15.0	15.0	15.0	14.7	15.0	15.0	18.5	18.5	18.2	19.4	19.4	18.5	18.8			
rid-5b	7.4	7.6	6.8	5.6	7.9	9.1	6.5	6.2	6.2	13.5	12.9	11.2	12.9	16.5	15.9	15.6	15.6	15.9	15.9	15.9	15.6	15.9	15.9	18.2	18.2	17.9	19.7	19.7	19.4	19.7			
rid-6b	7.1	7.9	7.1	5.9	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	13.2	13.2	11.5	13.2	15.6	15.0	14.7	14.7	15.0	15.0	15.0	14.7	15.0	15.0	17.9	17.9	17.6	18.8	20.0	18.5	18.8			
rid-7b	7.1	7.9	7.1	5.9	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	12.6	12.6	11.5	13.2	16.2	15.6	15.3	15.3	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.0	18.5	18.5	18.2	18.8	20.0	18.5	18.8			
rid-8b	7.1	7.9	7.1	5.9	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	12.6	12.6	11.5	13.2	15.6	15.0	14.7	14.7	15.0	15.0	15.0	14.7	15.0	15.6	18.5	18.5	18.2	18.8	20.0	19.1	19.4			
rid-9b	7.1	7.9	7.1	5.9	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	13.2	13.2	11.5	13.2	16.2	15.6	15.3	15.3	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.6	18.5	18.5	18.2	19.4	20.6	19.1	19.4			
rid-10b	6.8	7.6	6.8	5.6	7.4	8.5	5.9	5.6	5.6	12.9	12.9	11.2	12.9	15.9	15.3	15.0	15.0	15.3	15.3	15.3	15.0	15.3	15.3	18.2	18.2	17.9	19.1	20.3	18.8	19.1			
rid-11b	7.6	7.9	7.1	5.9	8.2	8.8	6.8	6.5	6.5	13.8	13.2	11.5	13.2	16.8	16.2	15.9	15.3	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.6	17.9	17.9	17.6	20.0	20.0	19.7	20.0			
rid-12b	6.8	7.6	6.8	5.6	7.4	8.5	5.9	5.6	5.6	13.5	13.5	11.8	13.5	15.9	15.3	15.0	15.0	15.3	15.3	15.3	15.0	15.3	15.9	18.8	18.8	18.5	19.7	20.9	19.4	19.7			
rid-13b	7.1	7.9	7.1	5.3	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	13.2	12.6	11.5	13.2	16.2	15.6	15.3	15.3	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.6	18.5	18.5	18.2	19.4	20.0	19.1	19.4			
rid-14b	7.1	7.4	6.5	5.3	7.6	8.8	6.8	6.5	6.5	13.2	12.6	10.9	12.6	16.2	15.6	15.3	15.3	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.6	17.9	17.9	17.6	19.4	19.4	19.1	19.4			
rid-15b	6.8	7.6	6.8	5.6	7.4	8.5	5.9	5.6	5.6	12.4	12.4	10.6	12.4	15.3	14.7	15.0	14.4	14.7	14.7	14.7	14.4	14.7	14.7	18.2	18.2	17.9	18.5	19.7	18.2	18.5			
rid-16b	7.1	7.4	6.5	5.9	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	12.6	12.6	10.3	12.1	15.6	15.0	15.3	14.7	15.0	15.0	15.0	14.7	15.0	15.0	17.9	17.9	17.6	18.8	19.4	18.5	18.8			
rid-17b	7.1	7.9	7.1	5.3	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	13.2	12.6	11.5	13.2	16.2	15.6	15.3	15.3	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.6	18.5	18.5	18.2	19.4	20.0	19.1	19.4			
rid-18b	7.1	7.4	6.5	5.3	7.6	8.8	6.2	5.9	5.9	13.2	12.6	10.9	12.6	16.2	15.6	15.3	15.3	15.6	15.6	15.6	15.3	15.6	15.6	17.9	17.9	17.6	19.4	19.4	19.1	19.4			
rid-19b	7.6	7.9	7.1	5.9	8.2	9.4	6.8	6.5	6.5	13.8	13.2	11.5	13.2	16.8	16.2	15.9	15.9	16.2	16.2	16.2	15.9	16.2	16.2	17.9	17.9	17.6	20.0	20.0	19.4	19.7	20.0		
cf.rid-1	2.6	3.8	2.9	4.1	4.1	5.3	5.0	4.7	4.1	12.4	12.4	11.8	12.9	13.8	13.5	12.6	13.8	14.1	14.1	14.4	14.1	14.1	14.7	17.9	17.9	17.6	19.4	20.3	18.5	18.8			
cf.rid-2	2.4	3.5	2.6	3.8	3.8	5.6	5.3	5.0	4.4	12.1	12.1	12.1	13.2	14.1	13.8	12.9	14.1	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4	15.0	18.2	18.2	17.9	19.7	20.6	18.2	18.5			
cf.rid-3	2.6	3.2	2.4	3.5	3.5	5.3	5.0	4.7	4.1	11.8	11.8	11.8	12.9	13.8	13.5	12.6	13.8	14.1	14.1	14.1	14.1	14.1	14.7	17.9	17.9	17.6	19.4	20.3	17.9	18.2			
cf.rid-4	2.1	3.2	2.4	3.5	3.5	5.9	5.0	4.7	4.1	12.4	12.4	11.8	13.5	14.4	13.5	13.2	14.4	14.7	14.7	15.0	14.7	14.7	14.7	18.2	18.2	17.9	20.0	20.6	18.5	18.8			
cf.rid-5	2.6	3.8	2.9	3.5	4.1	6.5	5.6	5.3	4.7	12.4	11.8	11.8	13.5	14.4	13.5	13.2	14.4	14.7	14.7	15.0	14.7	14.7	14.7	18.5	18.5	18.2	20.3	20.3	18.8	19.1			
cf.rid-6	2.4	3.5	2.6	3.8	3.8	6.2	5.3	5.0	4.4	12.6	12.6	12.1	13.8	14.7	13.8	13.5	14.7	15.0	15.0	14.7	15.0	15.0	15.0	18.5	18.5	18.2	20.3	20.9	18.8	19.1			
cf.rid-7	3.2	1.2	0.6	4.1	4.1	6.5	5.6	5.3	4.7	13.2	13.2	11.2	12.9	15.0	14.1	13.8	15.0	15.0	15.3	15.6	15.3	15.3	15.0	17.9	17.9	17.6	20.6	20.0	18.5	18.8			
cf.rid-8	2.4	3.5	2.6	3.8	3.8	6.2	5.3	5.0	4.4	12.1	12.1	11.5	13.2	14.1	13.2	12.9	14.1	14.4	14.4	14.7	14.4	14.4	14.4	18.2	18.2	17.9	20.0	20.6	18.5	18.8			
cf.rid-9	2.6	3.8	2.9	3.8	3.2	6.2	5.3	5.0	4.4	12.1	12.1	11.2	12.9	14.7	13.8	13.5	14.7	15.0	15.0	15.3	15.0	15.0	14.4	18.2	18.2	17.9	20.3	20.6	18.8	19.1			
cf.rid-11	2.4	3.5	2.6	3.8	3.8	5.6	5.3	5.0	4.4	12.6	12.6	12.1	13.8	14.1	13.2	12.9	14.7	15.0	15.0	15.3	15.0	14.4	15.0	17.9	17.9	17.6	20.3	20.3	18.8	19.1			
cf.rid-12	2.4	4.1	3.2	3.8	3.8	5.6	5.3	5.6	4.4	12.1	12.1	12.1	12.6	14.1	13.8	13.5	14.7	15.0	15.0	15.3	15.0	15.0	15.6	18.2	18.2	17.9	19.7	20.6	18.2	18.5			
cf.rid-13	2.9	4.1	3.2	3.8	4.4	6.2	4.7	4.4	3.8	12.6	12.6	12.1	13.8	14.7	13.8	13.5	14.7	15.0	15.0	15.3	15.0	15.0	15.0	17.6	17.6	17.4	20.3	20.3	19.4	19.7			
cf.rid-14	2.6	3.8	2.9	3.5	4.1	5.9	4.4	4.1	3.5	12.4	12.4	11.8	13.5	14.4	13.5	13.2	14.4	14.7	14.7	15.0	14.7	14.7	14.7	17.9	17.9	17.6	20.0	20.6	19.1	19.4			
cf.rid-15	—	4.1	3.8	5.0	3.8	7.4	5.9	5.6	5.0	13.8	13.8	12.9	14.1	15.3	14.4	14.7	15.3	15.6	15.6	15.3	15.0	15.6	15.6	17.6	17.6	17.4	21.8	20.9	19.4	19.7			
cf.rid-16	9/5	—	1.8	5.0	5.0	7.4	5.9	5.6	5.0	13.5	13.5	12.1	13.8	15.3	14.4	14.1	15.3	15.3	15.6	15.9	15.6	15.6	15.9	18.8	18.8	18.5	21.5	20.3	19.4	19.7			
cf.rid-17	8/5	4/2	—	4.1	4.7	6.5	5.6	5.3	4.7	13.8	13.8	11.5	13.2	14.7	13.8	13.5	14.7	14.7	15.0	15.3	15.0	15.0	14.7	18.2	18.2	17.9	20.3	20.3	19.1	19.4			
cf.rid-18	14/3	11/6	8/6	—	4.7	5.0	4.4	4.7	4.1	11.8	11.2	11.8	13.5	12.9	12.4	12.6	13.2	13.5	13.5	13.8	13.5	13.5	14.1	17.9	17.9	17.6	20.0	20.3	17.9	18.2			
cf.rid-19	10/3	11/6	10/6	14/2	—	7.1	6.2	5.9	4.1	12.4	12.4	12.6	13.8	15.6	14.7	14.4	15.6	15.9	15.9	16.2	15.9	15.9	15.3	19.1	19.1	18.8	20.6	21.5	19.1	19.4			
R.spec-1	23/2	20/5	17/5	16/1	23/1	—	4.4	4.7	5.3	11.5	11.5	12.6	13.8	12.6	12.4	12.1	13.2	13.5	13.5	13.8	13.5	12.9	14.1	17.9	17.9	17.6	19.1	20.9	18.2	18.5			
bed-1	18/2	15/5	14/5	14/1	20/1	15/0	—	0.3	2.1	11.8	11.8	11.8	13.5	12.9	12.1	12.9	13.5	13.8	13.8	14.1	13.8	13.8	14.4	18.8	18.8	18.5	18.8	20.3	19.1	19.4			
bed-2	17/2	14/5	13/5	15/1	19/1	16/0	1/0	—	1.8	12.1	td																						

Publikationsliste

PLÖTNER, J., P. BEERLI, T. UZZELL, C. SPOLSKY, **T. OHST**, S. N. LITVINCHUK, G.-D. GUEx, H.-U. REYER & H. HOTZ (2008): Widespread unidirectional interspecies transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology*. Im Druck.

OHST, T., J. PLÖTNER, F. MUTSCHMANN & Y. GRÄSER (2006): Chytridiomykose - eine Infektionskrankheit als Ursache des globalen Amphibiensterbens? *Zeitschrift für Feldherpetologie* 13: 149-163.

OHST, T., Y. GRÄSER, F. MUTSCHMANN & J. PLÖTNER (2005): The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* - a threat to global amphibian populations. *Mycoses* 48 (Suppl. 2): 8.

OHST, T., S. DE HOOG, W. PRESBER, V. STAVRAKIEVA & Y. GRÄSER (2004): Origins of Microsatellite Diversity in the *Trichophyton rubrum*- *T. violaceum* Clade (Dermatophytes). – *Journal of Clinical Microbiology* 42 No.10: 4444-4448.

PLÖTNER, J. & **T. OHST** (2001): New hypotheses on the systematics of the western Palearctic water frog complex (Anura, Ranidae). *Mitteilungen des Museums für Naturkunde, Zoologische Reihe* 77(1): 5-21.

PLÖTNER, J., **T. OHST**, W. BÖHME & R. SCHREIBER (2001): Divergence in mitochondrial DNA of Near Eastern water frogs with special reference to the systematic status of Cypriote and Anatolian populations (Anura, Ranidae). *Amphibia-Reptilia* 22(4): 397-412.

Vorträge auf Konferenzen:

OHST, T., Y. GRÄSER, F. MUTSCHMANN & J. PLÖTNER (2005): The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* - a threat to global amphibian populations? 2nd Trends in Medical Mycology, Berlin.

Berlin, 08. Mai 2008

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit hilfreich unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Zeller ermöglichte mir die Anfertigung der vorliegenden Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Museum für Naturkunde. Ich danke ihm für die Betreuung sowie finanzielle Unterstützung.

Das persönliche und freundschaftliche Engagement von Dr. Jörg Plötner, von der Planung bis zum Abschluss, war unabdingbare Voraussetzung für die Entstehung dieser Arbeit. Seine stetige Begleitung der Promotionsarbeit beinhaltete, neben experimenteller Unterstützung, die Schaffung der materiellen Voraussetzungen sowie einen andauernden fachlichen Diskurs.

Vielfältige Hilfestellungen konnte ich darüber hinaus von PD. Dr. Yvonne Gräser erhalten, die mir mit hilfreichen Ratschlägen und motivierenden Diskussionen weiter half, aber auch erhebliche Mittel zur Verfügung stellte.

Tatkräftige Unterstützung bei den Laborarbeiten erhielt ich von Robert Schreiber und Kai-Joachim Schultze, der auch viele fachliche Anregungen beisteuerte. Darüber hinaus standen mir zahlreiche weitere Kollegen vom Museum für Naturkunde mit ihrem Fachwissen zur Seite.

Besonders hervorzuheben sind auch die Gastwissenschaftler Marie-Gaëlle Dallay und Cigdem Akin, die mich bei der Bearbeitung des umfangreichen Probenmaterials maßgeblich unterstützten. Praktische Hilfe und Ratschläge konnte ich außerdem von Dr. Frank Mutschmann und Rahul Sharma erhalten.

Für die Bereitstellung von Probenmaterial bedanke ich mich bei: Hansjürg Hotz, Gaston-Denis Guex, Heinz-Ulrich Reyer (Zürich), Spartak N. Litvinchuk (St. Petersburg), Alain Pagano (Angers), Cigdem Akin, Tarek Jdeidi, C. Can Bilgin (Ankara), Dirk Schmeller (Leipzig), Andreas Nöllert (Jena), Rainer Günther (Berlin) und Wolfgang Böhme (Bonn).

Die finanzielle Förderung durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt, die mir auch über den ursprünglich geplanten Rahmen hinaus Mittel gewährte, ermöglichte erst die intensive Bearbeitung dieses interessanten Themas.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an meine liebe Familie, die maßgebliche Grundlagen zur Durchführung der Arbeit legte und diese mit viel Verständnis und Interesse begleitete.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Dissertation wurde in dieser oder einer ähnlichen Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, 08. Mai 2008